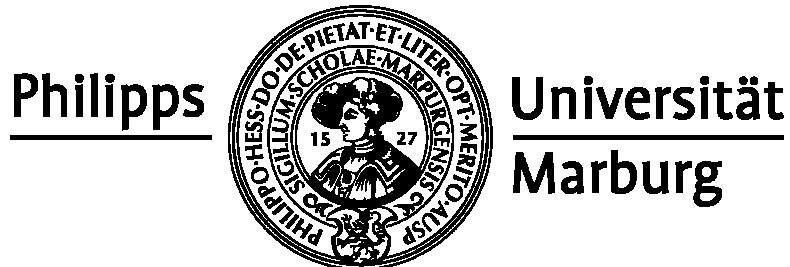


Aus dem Institut für Zytobiologie und Zytopathologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Roland Lill
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



**Funktionelle Defekte der humanen Proteine
ISCA1, ISCA2 und IBA57 beeinträchtigen die
Reifung mitochondrialer Fe/S-Proteine und
führen zu mitochondrialen Erkrankungen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Diplom-Humanbiologin
Claudia Stümpfig geb. Wilbrecht
aus Apolda

Marburg, 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 26.02.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Roland Lill

1. Korreferent: Prof. Dr. Friedemann Weber

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	2
SUMMARY	4
1. EINLEITUNG	6
2. ERGEBNISSE	14
2.1 DIE HUMANEN PROTEINE ISCA1, ISCA2 UND IBA57 SIND ESSENZIELL FÜR DIE REIFUNG MITOCHONDRIALER [4Fe-4S]-PROTEINE	14
2.2 EINE PUNKTMUTATION IM IBA57-GEN VERURSACHT SCHWERE MYOPATHIE UND ENZEPHALOPATHIE IM MENSCHEN	20
2.3 EINE SPLEIßMUTATION IM IBA57-GEN VERURSACHT EINE BESONDERE FORM DER ERBLICHEN SPASTISCHEN PARAPLEGIE	24
3. DISKUSSION	27
4. LITERATURVERZEICHNIS.....	39
5. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	48
6. ANHANG.....	50
6.1 THE HUMAN MITOCHONDRIAL ISCA1, ISCA2, AND IBA57 PROTEINS ARE REQUIRED FOR [4Fe-4S] PROTEIN MATURATION.....	51
6.2 MUTATION OF THE IRON-SULFUR CLUSTER ASSEMBLY GENE IBA57 CAUSES SEVERE MYOPATHY AND ENCEPHALOPATHY	65
6.3 Fe/S PROTEIN ASSEMBLY GENE IBA57 MUTATION CAUSES HEREDITARY SPASTIC PARAPLEGIA.....	81
7. ANGABE DER EIGENEN ANTEILE AN DEN FÜR DIE DISSERTATION BERÜCKSICHTIGTEN PUBLIKATIONEN	104
8. WEITERE PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE	105
9. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	106
10. DANKSAGUNG.....	107

Zusammenfassung

Eisen-Schwefel- (Fe/S-) Cluster sind anorganische Proteinkofaktoren und für das Leben essenziell. Diese Kofaktoren üben in der Zelle verschiedenste Funktionen aus. So vermitteln Fe/S-Cluster einiger Proteine den Transport von Elektronen, wohingegen andere für die Katalyse enzymatischer Reaktionen benötigt werden. Weiterhin gibt es Fe/S-Proteine, die als Sauerstoffsensoren agieren oder an der Regulation der Genexpression bestimmter Proteine beteiligt sind. Nicht zuletzt spielen Fe/S-Cluster eine entscheidende Rolle für die Stabilität mancher Proteine. Die Synthese aller zellulären Fe/S-Proteine unterliegt einem komplexen, hochkonservierten Mechanismus und ist abhängig von den Mitochondrien. In diesem Organell ist die Fe/S-Cluster- (ISC) Assemblierungsmaschinerie lokalisiert. Der zentrale Teil der ISC-Assemblierungsmaschinerie wird für die Biogenese mitochondrialer [2Fe-2S]-Proteine und aller cytosolischen/nukleären Fe/S-Proteine benötigt. Für die Reifung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine sind zusätzlich weitere ISC-Mitglieder erforderlich. Zu diesen spät-agierenden Faktoren gehören u.a. die sogenannten A-Typ Proteine und das Protein Iba57. Die Funktion dieser Proteine konnte durch diverse Studien in Bakterien und Hefe aufgeklärt werden. Zu ihren humanen Homologen, den A-Typ Proteinen ISCA1 und ISCA2, sowie IBA57 lagen hingegen zu Beginn dieser Arbeit kaum funktionelle Untersuchungen vor.

Die vorliegende Arbeit hatte daher als erstes Ziel, die Rolle der humanen Proteine ISCA1, ISCA2 und IBA57 für die zelluläre Fe/S-Proteinbiogenese aufzuklären. Hierfür wurden die drei Proteine in humaner Zellkultur depletiert und der jeweilige Depletionsphänotyp biochemisch und molekularbiologisch untersucht. Es zeigte sich, dass alle drei Proteine ausschließlich an der Reifung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine beteiligt sind. Im Gegensatz dazu spielen sie keine Rolle für die Maturierung mitochondrialer [2Fe-2S]-Proteine und cytosolischer/nukleärer Fe/S-Proteine. Damit konnte die konservierte Funktion der ISCA Proteine und des IBA57 Proteins in der mitochondrialen [4Fe-4S]-Proteinbiogenese bestätigt werden.

Als zweites Projekt dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Mutationen im *IBA57*-Gen untersucht, die zu zwei unterschiedlichen Krankheitsbildern im Menschen führten. So war im ersten Fall das Krankheitsbild durch eine schwere Form der Myopathie und Enzephalopathie gekennzeichnet, die nach der Geburt zum baldigen Tode führte. Im zweiten Fall litten die Patienten an einer besonderen Form der erblichen spastischen Paraplegie, die mit optischer Atrophie und peripherer Neuropathie einhergeht, genannt SPOAN. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die jeweiligen Mutationen in *IBA57* hinsichtlich ihres Einflusses auf die Expression des Proteins

analysiert. Im Krankheitsfall 1 zeigte sich, dass eine Punktmutation in *IBA57* zu einem nahezu vollständigen Verlust des Proteins führte. Im Krankheitsfall 2 hingegen bewirkte eine Spleißmutation in *IBA57* die Bildung eines anormalen, verkürzten Spleißprodukts, welches nicht translatiert wurde. Zusätzlich verblieb eine gewisse Menge des normalen IBA57-Spleißprodukts, was zu einer geringfügigen Proteinmenge in den Patientenzellen führte. Im Anschluss an die molekulargenetischen Untersuchungen wurde der biochemische Phänotyp der Patientenzellen untersucht. Hierdurch sollte die Frage beantwortet werden, ob Mutationen in *IBA57* ursächlich für die beschriebenen Krankheitsbilder sein können. Durch Analyse von Patientenmaterial zeigte sich in beiden Fällen, dass die Reifung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine gestört war, wohingegen die Maturierung mitochondrialer [2Fe-2S]-Proteine und cytosolischer/nukleärer Fe/S-Proteine normal verlief. Dabei wiesen Patientenzellen der Gruppe 1, die nahezu kein IBA57 Protein besaßen, eine stärkere Beeinträchtigung der Fe/S-Proteinbiogenese auf als Zellen der Gruppe 2. Der biochemische Phänotyp in IBA57-defizienten Patientenzellen deckt sich mit den funktionellen Daten, die durch Depletion von IBA57 im Modellorganismus Hefe oder in humaner Zellkultur gewonnen wurden. Daher ist davon auszugehen, dass die identifizierten Mutationen in *IBA57* tatsächlich ursächlich für die zwei vorliegenden Krankheitsbilder sind. Die graduellen biochemischen Unterschiede sind sehr wahrscheinlich auf die unterschiedlichen IBA57-Proteinlevel in beiden Patientengruppen zurückzuführen. Dieser Expressionsunterschied spielt womöglich eine Rolle für die Entwicklung zweier so unterschiedlicher klinischer Erscheinungsbilder.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die drei humanen ISC-Faktoren ISCA1, ISCA2 und IBA57 essenziell für die Reifung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine sind. Ihre Rolle als spät-agierende ISC-Assemblierungsfaktoren ist demnach von Bakterien bis hin zum Menschen konserviert. Darüber hinaus konnte die in Modellsystemen postulierte Funktion von IBA57 durch Untersuchungen an IBA57-defizienten Patientenzellen bestätigt werden.

Summary

Iron-sulfur- (Fe/S-) clusters are inorganic protein cofactors and are essential for life. These cofactors perform various tasks within a cell. For instance, Fe/S clusters of some proteins are required for the transport of electrons, whereas others mediate enzyme catalysis. Additionally, Fe/S proteins can act as oxygen sensors or participate in the regulation of gene expression. Finally, Fe/S clusters are necessary for the stability of several proteins. Synthesis of all cellular Fe/S proteins requires a complex and highly conserved mechanism, and is dependent on mitochondria. In this organelle the so-called Fe/S-cluster- (ISC) assembly machinery is localised. The core part of the ISC-assembly machinery mediates biogenesis of both mitochondrial [2Fe-2S]-proteins and all cytosolic/nuclear Fe/S proteins. Maturation of mitochondrial [4Fe-4S]-proteins requires additional ISC members. These late-acting ISC factors include the so-called A-type proteins and Iba57. The function of these proteins was elucidated via several studies in bacteria and yeast. However, functional data on the human homologues ISCA1, ISCA2 and IBA57 were missing at the beginning of this work.

The first part of the present work aimed to clarify the role of human ISCA1, ISCA2 and IBA57 in cellular Fe/S protein biogenesis. To this end, all three proteins were depleted in human cell culture in order to analyse the depletion phenotype via various biochemical and molecular biological methods. These analyses showed that ISCA1, ISCA2 and IBA57 exclusively participate in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S]-proteins. In contrast, biogenesis of mitochondrial [2Fe-2S]-proteins and cytosolic/nuclear Fe/S proteins was independent of these three ISC proteins. Collectively, these data showed the conserved role of the human ISCA proteins and IBA57 in mitochondrial [4Fe-4S]-protein biogenesis.

In the second part of this work, the biochemical consequences of two different pathogenic mutations in *IBA57* were investigated. These mutations were linked to two distinct human diseases. The first case was characterized by severe myopathy and encephalopathy, and was lethal in early infancy. In contrast, patients suffering from the second mutation developed a rare form of hereditary spastic paraplegia combined with optic atrophy and peripheral neuropathy, called SPOAN. Initially, the impact of these mutations on the expression of IBA57 protein was measured. In the first case a point mutation in *IBA57* caused a decrease in protein below physiologically critical levels, whereas in the second case a splice mutation generated an aberrant truncated splice product which was not translated. However, in that case a minor portion of normally spliced IBA57 mRNA remained in the patients' cells leading to the production of minute amounts of wild-type IBA57. Finally, it was evaluated if mutations in *IBA57* were

causative for the disease phenotypes. Analysis of cell material derived from both patient groups revealed an impaired maturation of mitochondrial [4Fe-4S]-proteins. In contrast, formation of mitochondrial [2Fe-2S]-proteins and cytosolic/nuclear Fe/S proteins was normal. Interestingly, the effect on Fe/S protein biogenesis was stronger in patient cells of the first group lacking IBA57 protein. The biochemical phenotype of the patient cells reflects functional data achieved by IBA57 depletion in yeast and human cell culture. Thus, the identified mutations in *IBA57* are likely causative for the two presented diseases. The biochemical variations in both patient groups are probably a result of the differences in IBA57 protein expression. In all likelihood, these expression differences contribute to the development of the two completely different disease phenotypes.

In summary, the human ISC factors ISCA1, ISCA2 and IBA57 are essential for the formation of mitochondrial [4Fe-4S]-proteins. The function as late-acting ISC assembly factors is conserved from Bacteria to man. The hypothesized role of IBA57 in mitochondrial [4Fe-4S]-protein biogenesis was verified by analysis of IBA57-deficient patient cells.

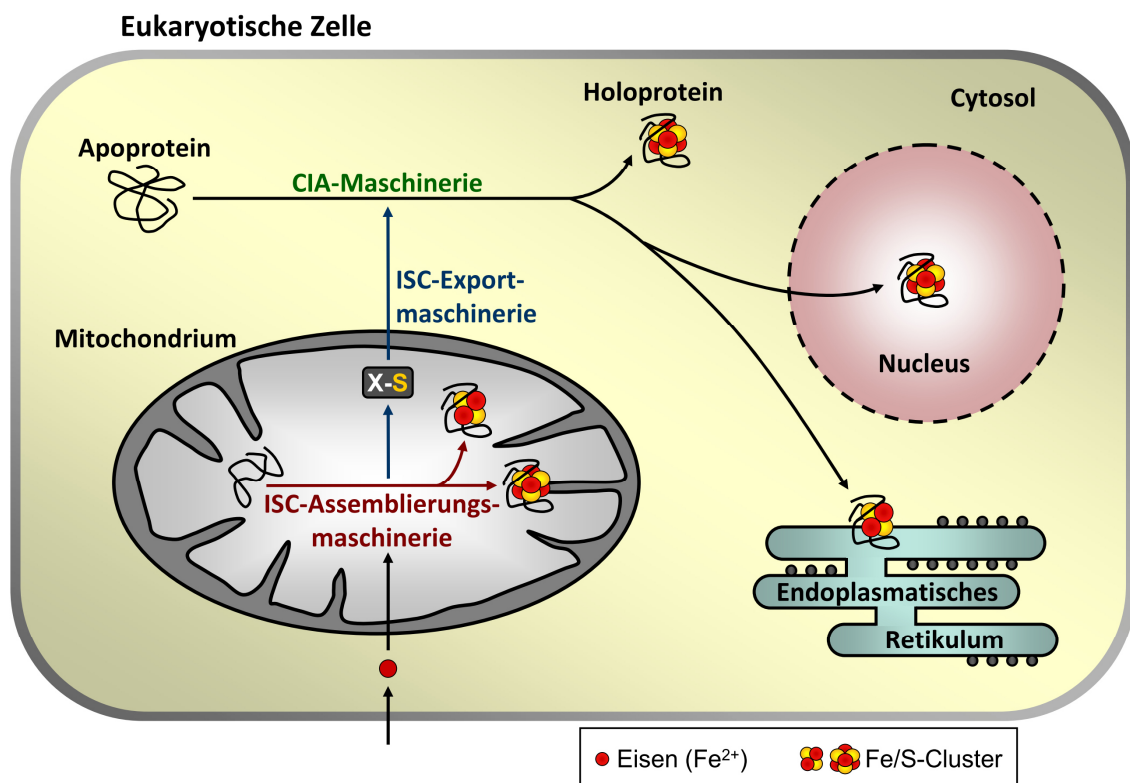
1. EINLEITUNG

Für die Funktionsweise einer Reihe von Proteinen sind verschiedenartige Kofaktoren unerlässlich. Zu den anorganischen Kofaktoren zählen bestimmte Eisen-Schwefel-Verbindungen, im Folgenden Fe/S-Cluster genannt. Sie sind evolutionär betrachtet sehr alte Strukturen und sowohl in Archaea als auch in Bakterien und Eukaryoten zu finden. In der eukaryotischen Zelle wurden Fe/S-Proteine bislang im Cytosol, den Mitochondrien und Plastiden, am endoplasmatischen Retikulum sowie im Zellkern identifiziert. Zu den am weitesten verbreiteten Fe/S-Clustern zählt die kubische [4Fe-4S]-Form, welche durch die Verbindung von vier Eisenionen ($\text{Fe}^{2+/3+}$) und vier Schwefelionen (S^{2-}) entsteht. Die rhombische [2Fe-2S]-Variante wird durch je zwei $\text{Fe}^{2+/3+}$ - und S^{2-} -Ionen gebildet (Beinert et al., 1997). Darüber hinaus gibt es weitere, komplexere Formen von Fe/S-Clustern, in denen ebenso andere Ionen wie beispielsweise Molybdän im Falle der Nitrogenase gebunden sein können (Hu and Ribbe, 2013; Peters and Broderick, 2012). Am häufigsten werden Fe/S-Cluster über den Schwefel der Cysteinreste koordiniert. In einigen Fällen können aber auch Histidin oder Arginin als Liganden des Fe/S-Clusters dienen (Lill and Mühlenhoff, 2008).

Fe/S-Proteine können recht verschiedene Funktionen ausüben. Durch den zügigen Wechsel zwischen beiden Oxidationsformen des Eisenions ($\text{Fe}^{2+/3+}$) innerhalb des Fe/S-Clusters sind diese Verbindungen hervorragend geeignet für den Elektronentransport. So sind Fe/S-Proteine beispielsweise innerhalb der Komplexe I, II und III der mitochondrialen oder bakteriellen Atmungskette, oder im Photosystem I photosynthetischer Organismen enthalten (Romberger and Golbeck, 2010; Sheftel et al., 2010a). Einige Fe/S-Proteine, wie die Aconitase oder die Liponsäuresynthase (engl. lipoic acid synthase; LIAS), benötigen ihren Kofaktor für die enzymatische Katalyse chemischer Reaktionen (Dupuy et al., 2006; Harmer et al., 2014). Andere Fe/S-Proteine dienen als Sensoren der Umwelt und agieren dabei als Regulatoren der Genexpression. Dies ist etwa der Fall bei dem humanen Eisenregulationsprotein 1 (engl. iron regulatory protein 1; IRP1). Bindet dieses Protein einen [4Fe-4S]-Cluster, fungiert es als cytosolische Aconitase. Bei Verlust des Clusters hingegen, etwa bei vorliegendem Eisenmangel innerhalb der Zelle, beeinflusst IRP1 die Expression bestimmter an der zellulären Eisenhomöostase beteiligter Proteine (Volz, 2008). Dabei bindet IRP1 direkt an Haarnadelstrukturen, sog. „iron-responsive elements“ (IREs), in deren mRNAs. Andere Fe/S-Proteine tragen sauerstoffsensitive Fe/S-Cluster und wirken dadurch als O_2 -Sensoren (Zhang et al., 2012). Ferner kann Fe/S-Clustern eine strukturstabilisierende Funktion zugesprochen werden. Zu dieser Gruppe gehören einige Proteine, die in die DNA-Replikation und -Reparatur involviert sind, wie etwa die

eukaryotischen DNA-Polymerasen Pol α , Pol ϵ , Pol δ und Pol ζ , sowie die XPD DNA-Helikase, welche im Zusammenhang mit der Hautkrankheit Xeroderma pigmentosum steht (Netz et al., 2011; White, 2009).

Aufgrund der ubiquitären Verbreitung und facettenreichen Funktionen, die durch Fe/S-Proteine vermittelt werden, ist ein genaues Verständnis der Biosynthese dieser Proteinklasse essentiell. In den letzten Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, um den Mechanismus der Fe/S-Proteinbiogenese mit Hilfe von Modellorganismen wie *Escherichia coli* (*E. coli*) oder der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) detailliert aufzuklären. Dabei zeigte sich, dass die eukaryotische Fe/S-Proteinsynthese hinsichtlich Proteinausstattung und prinzipiell dem Mechanismus stark dem bakteriellen System ähnelt. Dies ist durch die bakterielle Herkunft der Mitochondrien leicht zu verstehen und stützt die Endosymbiontentheorie (Lill et al., 1999; Müller and Martin, 1999).



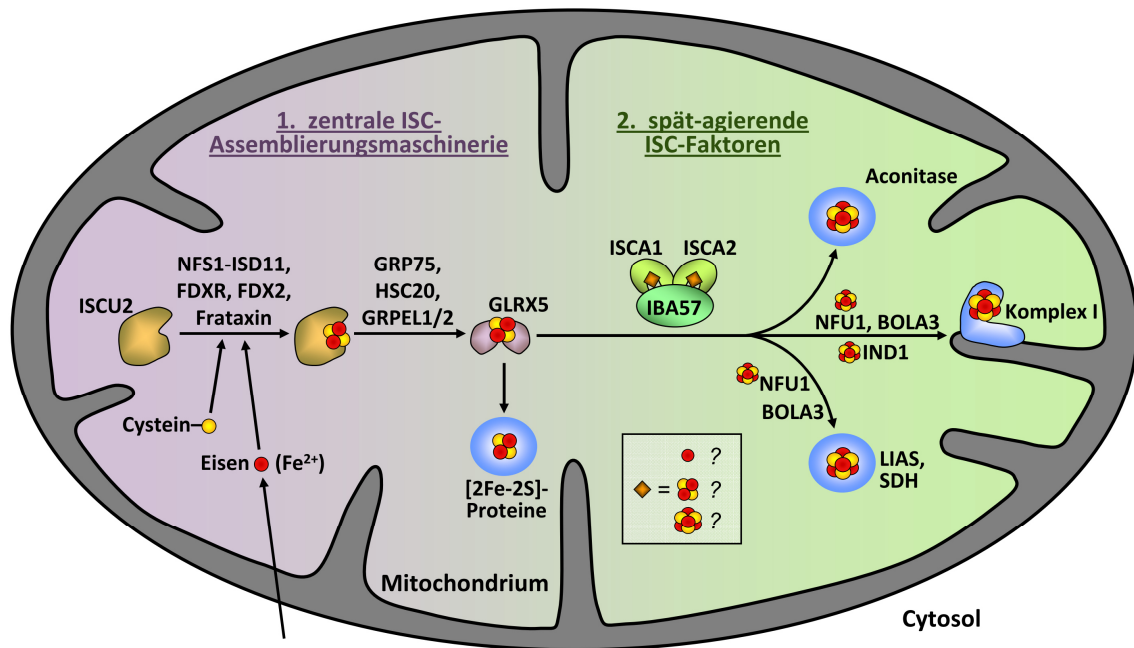
Übersichtsschema 1. Mitochondrien sind essenziell für die Synthese aller zellulären Fe/S-Proteine. Die Biogenese von Fe/S-Proteinen in Eukaryoten beginnt im Mitochondrium und benötigt Eisen, das aus dem Cytosol in die Matrix transportiert wird. Die mitochondriale Fe/S-Cluster-Assemblierungsmaschinerie (ISC-Assemblierungsmaschinerie) katalysiert die Reifung von Fe/S-Proteinen in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten. Zunächst werden [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Cluster *de novo* synthetisiert und im Anschluss auf entsprechende mitochondriale Apoproteine übertragen. Darüber hinaus stellt die ISC-Assemblierungsmaschinerie eine schwefelhaltige Komponente (X-S) her, die mittels der ISC-Exportmaschinerie in das Cytosol transportiert wird. Dort wird der Schwefel von der cytosolischen Fe/S-Protein-Assemblierungsmaschinerie (CIA-Maschinerie) für die Bildung von Fe/S-Clustern verwendet, welche auf cytosolische, nukleäre und endoplasmatische Apoproteine übertragen werden. Modell adaptiert von (Shefftel et al., 2010a).

In der eukaryotischen Zelle sind die Mitochondrien unabdingbar für die Synthese aller zellulären Fe/S-Proteine (Übersichtsschema 1). In diesen Organellen ist die sogenannte Eisen-Schwefel-Cluster-Assemblierungsmaschinerie (ISC-Assemblierungsmaschinerie von engl. iron sulfur cluster assembly machinery) lokalisiert, welche die Reifung mitochondrialer [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Proteine vermittelt. Weiterhin liefert dieses System eine schwefelhaltige Komponente mittels der sog. ISC-Exportmaschinerie an das Cytosol (Kispal et al., 1999; Qi et al., 2014; Schaedler et al., 2014; Srinivasan et al., 2014). Hier wird der Schwefel der cytosolischen Fe/S-Cluster-Assemblierungsmaschinerie (CIA-Maschinerie von engl. cytosolic Fe/S protein assembly machinery) zugeführt, welche die Reifung cytosolischer und nukleärer Fe/S-Proteine vermittelt (eine Übersicht zur CIA-Maschinerie findet sich in (Netz et al., 2014)).

Die eukaryotische ISC-Assemblierungsmaschinerie lässt sich in zwei Hauptphasen untergliedern. Durch die zentrale ISC-Assemblierungsmaschinerie wird die Bildung eines [2Fe-2S]-Clusters und dessen Übertragung auf mitochondriale [2Fe-2S]-Apoproteine vermittelt (Übersichtsschema 2 links). In einer zweiten Phase erfolgt die Konvertierung von [2Fe-2S]-Clustern zu einem [4Fe-4S]-Cluster. Diese Reaktion sowie die anschließende Übertragung auf mitochondriale Zielproteine erfolgt in Abhängigkeit von der zentralen ISC-Assemblierungsmaschinerie und erfordert zusätzliche Reifefaktoren, die den spät-agierenden ISC-Faktoren zugeordnet werden (Übersichtsschema 2 rechts).

Bis heute konnten zehn Mitglieder der zentralen ISC-Assemblierungsmaschinerie identifiziert werden (Übersichtsschema 2 links). Da der generelle Mechanismus bis hin zum Menschen konserviert ist, verwende ich im Folgenden nur die humanen Bezeichnungen. Die Fe/S-Clustersynthese findet auf dem Gerüstprotein ISCU2 statt, wobei je zwei Eisen- und Schwefelionen zum [2Fe-2S]-Cluster vereinigt werden (Garland et al., 1999; Schilke et al., 1999; Tong and Rouault, 2006). Der Cystein-Desulfurasekomplex NFS1-ISD11 liefert hierfür durch Konvertierung von Cystein zu Alanin den benötigten Schwefel, welcher noch zu Sulfid reduziert werden muss (Adam et al., 2006; Wiedemann et al., 2006; Zheng et al., 1994). Die dafür erforderlichen Elektronen werden durch eine Elektronentransportkette bestehend aus NAD(P)H, der Ferredoxinreduktase FDXR und dem Ferredoxin FDX2, einem [2Fe-2S]-Protein, bereitgestellt (Lange et al., 2000; Li et al., 2001; Sheftel et al., 2010b; Shi et al., 2012; Webert et al., 2014). Eisen gelangt zunächst durch das Transportprotein Mitoferrin (MFRN1/2) in Abhängigkeit vom Membranpotenzial in die Mitochondrien, wo es anschließend, evtl. durch die Vermittlung von Frataxin, für die Cluster-Biogenese auf ISCU2 verwendet wird (Paradkar et al., 2009; Shaw et al., 2006). Die genaue

molekulare Funktion von Frataxin konnte bisher allerdings nicht hinreichend geklärt werden. Einige Studien deuten auf eine direkte Rolle als Eisenlieferant hin, was durch die Interaktion von Frataxin mit den zentralen ISC-Faktoren ISCU2/NFS1/ISD11 unterstützt wird (Gerber et al., 2003; Schmucker et al., 2011). Andere Untersuchungen hingegen ziehen die mögliche Stimulation der Desulfuraseaktivität von NFS1 durch Frataxin in Betracht (Bridwell-Rabb et al., 2014; Pandey et al., 2014).



Übersichtsschema 2. Die mitochondriale ISC-Assemblierungsmaschinerie ist in zwei Phasen gegliedert. Die zentrale ISC-Assemblierungsmaschinerie ist essenziell für die Reifung mitochondrialer [2Fe-2S]-Proteine und aller cytosolischer/nukleärer Fe/S-Proteine. Zusätzlich werden die spät-agierenden ISC-Faktoren für die Maturierung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine benötigt. **Phase 1:** Die zentrale ISC-Assemblierungsmaschinerie gewährleistet zunächst die Synthese von [2Fe-2S]-Clustern auf dem Gerüstprotein ISCU2. Der benötigte Schwefel wird durch den Desulfurasekomplex NFS1-ISD11 mittels Konvertierung von Cystein zu Alanin gewonnen. Die Reduktion des Schwefels erfolgt durch eine Elektronentransportkette bestehend aus NAD(P)H, der Ferredoxinreduktase FDXR und dem Ferredoxin FDX2. An der Bereitstellung des Eisens ist vermutlich Frataxin beteiligt. Im Anschluss an die Bildung des [2Fe-2S]-Clusters wird dieser von ISCU2 mit Hilfe eines Hsp70-Chaperonsystems gelöst. Hierfür werden GRP75, das Cochaperon HSC20 und der Nucleotidaustauschfaktor GRPEL1/2 benötigt. Der [2Fe-2S]-Cluster wird zunächst transient auf das Glutaredoxin GLRX5 übertragen, bevor er von dort ohne weitere Hilfe in [2Fe-2S]-Apoproteine inseriert wird. **Phase 2:** GLRX5-gebundene [2Fe-2S]-Cluster werden mit Hilfe der spät-agierenden ISC-Faktoren zu einem [4Fe-4S]-Cluster konvertiert. Für diesen Prozess und die anschließende Übertragung auf entsprechende Apoproteine werden gleichsam ISCA1, ISCA2 und IBA57 benötigt. Beide ISCA-Proteine binden eine eisenhaltige Komponente, wobei die genaue Identität dieses Eisenkofaktors unter zellulären Bedingungen nicht bekannt ist (s. Box und Abschnitt 3). Neben diesen Reifefaktoren spielen weitere, spezialisiertere Proteine eine Rolle. NFU1 und BOLA3 sind vermutlich für die Reifung von Liponsäuresynthase (LIAS), Succinatdehydrogenase (SDH) und Komplex I essenziell, wohingegen IND1 ausschließlich für die Maturierung von Komplex I benötigt wird. Modell adaptiert von (Stehling et al., 2014).

Im Anschluss an die Assemblierung wird der [2Fe-2S]-Cluster von ISCU2 gelöst und in mitochondriale Apo-Zielproteine eingefügt. Die Cluster-Ablösung von ISCU2 erfordert ein Hsp70-Chaperonsystem bestehend aus GRP75, dem Cochaperon HSC20 und dem Nucleotid austauschfaktor GRPEL1/2. Der [2Fe-2S]-Cluster wird dann transient auf das Monothiol-Glutaredoxin GLRX5 übertragen, von dem eine Insertion in Apoproteine erfolgt (Shan and Cortopassi, 2012; Shan et al., 2007; Stehling et al., 2014).

Für die Reifung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine werden weitere ISC-Faktoren benötigt (Übersichtsschema 2 rechts). Hierzu zählen die in *S. cerevisiae* identifizierten Proteine Isa1, Isa2 und Iba57 (Gelling et al., 2008; Jensen and Culotta, 2000; Kaut et al., 2000; Pelzer et al., 2000). Isa1 und Isa2 gehören zur Familie der sogenannten A-Typ ISC-Proteine, welche zur Übertragung eines Fe/S-Clusters auf Apoproteine befähigt sind (Vinella et al., 2009). Die Deletion von *Isa1* führt in der Hefe zu einem Wachstumsdefekt, welcher durch die Expression verschiedener A-Typ Proteine aus *E. coli* komplementiert werden kann (Mühlenhoff et al., 2011). Dies zeigt, dass Isa1 als funktionelles Ortholog bakterieller A-Typ Proteine agiert. Isa2 hingegen ist spezifisch für Eukaryoten, und kann nicht durch prokaryotische A-Typ Proteine ersetzt werden. Dies ist wohl auf einen spezifischen Sequenzabschnitt in Isa2 zurückzuführen, welcher in keinen anderen A-Typ Proteinen vorkommt (Mühlenhoff et al., 2011). Iba57 weist eine hohe Sequenzhomologie zu diversen Tetrahydrofolat-bindenden Enzymen wie dem *E. coli* Homolog YgfZ auf (Gelling et al., 2008). YgfZ ist nur unter Folatbindung funktionell, und auch für eukaryotische Homologe wie Iba57 ist eine Abhängigkeit von Folat als Kofaktor denkbar (Waller et al., 2010). Mehrere Studien in *E. coli*, *S. cerevisiae* und *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) zeigen, dass Isa1, Isa2 und Iba57 für die Reifung gleichermaßen aller [4Fe-4S]-Proteine innerhalb der Mitochondrien benötigt werden (Long et al., 2011; Mühlenhoff et al., 2011; Tan et al., 2009). Darüber hinaus ließ sich in der Hefe die physische Interaktion zwischen allen drei Proteinen nachweisen, was die Wirkungsweise als funktionellen Komplex nahelegt (Gelling et al., 2008).

Zu Beginn dieser Arbeit lagen kaum Daten zu den humanen Homologen der drei Proteine, genannt ISCA1, ISCA2 und IBA57, vor. Da die ISC-Assemblierungsmaschinerie in ihren Grundzügen in allen Domänen des Lebens zu finden ist, erscheint jedoch eine funktionelle Konservierung auch dieser ISC-Faktoren naheliegend. Eine kürzlich veröffentlichte Studie konzentrierte sich auf die Analyse von ISCA1 und zeigte dessen Teilnahme an der Reifung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine in HeLa-Zellen (Song et al., 2009). Die Untersuchung lieferte ferner Hinweise auf eine zusätzliche cytosolische Expression von ISCA1 sowie dessen Interaktion mit dem CIA-Faktor

IOP1, woraufhin eine aktive Rolle der cytosolischen Variante bei der Reifung extra-mitochondrialer Fe/S-Proteine postuliert wurde. Nähere Untersuchungen zu ISCA2 und IBA57 wurden bisher nicht durchgeführt.

Im Rahmen meiner Arbeit sollte daher zunächst geklärt werden, ob die Rolle von ISCA1, ISCA2 und IBA57 als Maturierungsfaktoren mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine bis hin zum Menschen konserviert ist (s. Abschnitt 2.1). Zu diesem Zweck wurden mittels der RNA-Interferenztechnik (RNAi-Technik) in HeLa-Zellen die entsprechenden mRNAs von ISCA1, ISCA2 und IBA57 abgebaut, was zu einer massiven Depletion der Proteine führte. Anschließend wurden die daraus resultierenden Phänotypen hinsichtlich der Maturierung mutmaßlicher Zielproteine analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Funktionen aller drei Proteine in der Tat auch im Menschen konserviert sind. Sie sind ausschließlich für die Reifung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine erforderlich, besitzen jedoch keine Relevanz für die Maturierung mitochondrialer [2Fe-2S]-Proteine sowie cytosolischer/nukleärer Fe/S-Proteine (Übersichtsschema 2 rechts). Weiterhin war es ein Anliegen, die von Song und Kollegen angenommene cytosolische Funktion von ISCA1 mit weiteren biochemischen Analysen zu überprüfen. Da die ISCA1 und ISCA2 Proteine zu 25.4 % identisch sind (nach ExPASy/LALIGN, Huang and Miller, 1991), wurde für die erforderlichen Analysen auch eine mögliche cytosolische Variante von ISCA2 berücksichtigt. Unsere Daten legten jedoch nahe, dass sowohl ISCA1 als auch ISCA2 ausschließlich in Mitochondrien lokalisiert sind und als Teil der ISC-Assemblierungsmaschinerie agieren. Die forcierte Expression beider Proteine im Cytosol hingegen hatte keinen Einfluss auf die Maturierung extra-mitochondrialer Fe/S-Proteine.

Neben den ISCA-Proteinen und IBA57 wurden in den letzten Jahren weitere spät-agierende ISC-Faktoren identifiziert, die womöglich für die Übertragung des auf ISCA1/ISCA2 generierten [4Fe-4S]-Clusters auf bestimmte Zielproteine benötigt werden. So vermitteln NFU1 und BOLA3 die Inserierung des Clusters in die entsprechenden Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe I und II, sowie in LIAS (Cameron et al., 2011; Navarro-Sastre et al., 2011). IND1 hingegen weist die höchste Spezifität auf: Dieser ISC-Faktor wird ausschließlich für die Reifung der [4Fe-4S]-Untereinheiten von Komplex I benötigt (Bych et al., 2008; Sheftel et al., 2009; Stehling et al., 2014).

Die Deletion der meisten zentralen ISC-Faktoren ist in der Hefe letal (Lill, 2009). Der essentielle Charakter dieser Proteine spiegelt sich in diversen humanen Krankheiten wieder, welche auf Mutationen innerhalb der für die ISC-Faktoren kodierenden Gene beruhen. Bisher wurden elf der humanen ISC-Assemblierungs- und Exportfaktoren mit verschiedenen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht (Stehling et al., 2014).

So liegt etwa der neurodegenerativen Erkrankung Friedreich-Ataxie eine minimierte Expression oder Funktion von Frataxin zugrunde (Campuzano et al., 1996; Martelli et al., 2012). Das Krankheitsbild beinhaltet eine fortschreitende spinozerebelläre Ataxie, welche Bewegungsstörungen des gesamten Körpers bedingt. Auf zellulärer Ebene ist die Krankheit charakterisiert durch eine beeinträchtigte Fe/S-Proteinbiogenese, mitochondriale Eisenakkumulation sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Armstrong et al., 2010; Delatycki et al., 1999; Rötig et al., 1997). Die durch einen Spleißdefekt in *ISCU* bedingte Muskeldystrophie ist ein weiteres prominentes Beispiel für ISC-assoziierte Krankheiten (Mochel et al., 2008; Olsson et al., 2008). Interessanterweise sind die Auswirkungen dieses Defekts, der einen stark verringerten ISCU2-Proteinspiegel zur Folge hat, auf die gestreifte Muskulatur beschränkt (Crooks et al., 2012; Nordin et al., 2012), was im Patienten u.a. Muskelschwäche und Herzinsuffizienz-bedingte Belastungsintoleranz zur Folge hat. Diese Symptomatik lässt sich durch einen generellen Fe/S-Biogenesedefekt der betroffenen Gewebe erklären, welcher u.a. die Atmungskettenkomplexe I bis III betrifft und dadurch die ausreichende Versorgung mit ATP unterbindet (Hall et al., 1993; Haller et al., 1991). In letzter Zeit wurden weiterhin einige spät-agierende ISC-Reifefaktoren mit der Entwicklung humaner Erkrankungen in Verbindung gebracht. So führen Mutationen in *NFU1* und *BOLA3* zu Enzephalopathie und pulmonaler Hypertonie, die schon im frühen Kindesalter letal sind (Cameron et al., 2011; Navarro-Sastre et al., 2011). Eine Kombination aus Punkt- und Spleißmutation im *IND1*-Gen bedingt einen Verlust der Komplex I-Aktivität und geht einher mit mitochondrialer Enzephalopathie, die sich v.a. durch motorische Beeinträchtigungen ausdrückt (Kevelam et al., 2013).

Nach Veröffentlichung unserer Funktionsstudie zu den humanen ISC-Reifefaktoren ISCA1, ISCA2 und IBA57 (s. Abschnitt 2.1 und (Sheftel et al., 2012)) trat ein belgisches Forschungs- und Ärzteteam aus Gent und Antwerpen an uns heran. In ihrer Obhut lagen zwei Geschwisterkinder, die an schwerer Myopathie und Enzephalopathie litten und nach der Geburt rasch verstarben. Blutuntersuchungen offenbarten eine Lactatazidose und Hyperglycinämie, welche zusammen mit der vorliegenden schweren Hypotonie einen Atmungskettendefekt vermuten ließen. Tatsächlich legten weiterführende biochemische Analysen eine verminderte Aktivität der Atmungskettenkomplexe I und II sowie LIAS offen, woraufhin ein Defekt der Fe/S-Proteinsynthese angenommen wurde. Anschließende molekulargenetische Untersuchungen ergaben bei beiden Kindern eine homozygote Mutation im für IBA57 kodierenden Gen.

Einige Wochen später kontaktierte uns ein klinisches-neurogenetisches Forschungsteam aus Jerusalem und Paris, welches seit 10 Jahren eine blutsverwandte

Familie mit über mehrere Generationen auftretender spastischer Paraplegie betreut. Durch molekulargenetische Analysen ließ sich in den betroffenen Mitgliedern dieser Familie eine homozygote Mutation in *IBA57* ermitteln, wobei es sich hierbei um eine vom belgischen Fall abweichende Mutation handelt.

Wir sahen uns daher mit zwei völlig verschiedenen Krankheitsbildern konfrontiert – einerseits eine perinatal letale Enzephalomyopathie, andererseits fortschreitende spastische Paraparese, die den Betroffenen ein relativ normales Leben gestattet. Deshalb war in Kollaboration mit den beiden Forschungsteams zu klären, ob der gemeinsame Nenner beider Erkrankungen ein Defekt in *IBA57* sein kann, und warum die Mutationen zu solch unterschiedlichen Phänotypen führen (s. Abschnitt 2.2 und 2.3 und Ajit Bolar et al., 2013; Lossos et al., im Druck). Biochemische Untersuchungen der in Belgien betreuten Patienten hatten bereits auf einen Fe/S-Assemblierungsdefekt hingewiesen. Mit Hilfe weiterführender Analysen wurde nun überprüft, ob die detektierte Mutation in *IBA57* tatsächlich ursächlich für die Erkrankung ist und wie genau sich dieser Defekt auf die Expression von *IBA57* auswirkt. Auch im Falle der palästinensisch-arabischen Familie sollte ermittelt werden, inwieweit die Mutation in *IBA57* die Expression und Funktion des Proteins beeinflusst. Ferner gingen wir mittels Analyse von Patientenmaterial der Frage nach, ob dieser besonderen Form von spastischer Paraplegie tatsächlich ein Defekt in der Fe/S-Proteinsynthese zugrunde liegt.

Im folgenden Abschnitt werde ich die Ergebnisse der drei dieser Dissertation zugrunde liegenden Studien kurz zusammenfassen.

2. ERGEBNISSE

2.1 Die humanen Proteine ISCA1, ISCA2 und IBA57 sind essenziell für die Reifung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine

The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation.

Sheftel und Wilbrecht et al., Molecular Biology of the Cell, 2012

Die vorliegende Studie widmet sich der funktionellen Charakterisierung der humanen ISC-Faktoren ISCA1, ISCA2 und IBA57 in Zellkultur. Zunächst sollte die intrazelluläre Lokalisation von ISCA1, ISCA2 und IBA57 bestimmt werden. Hierfür wurden für das jeweilige Protein spezifische Antikörper hergestellt. HeLa-Zellen wurden mittels Digitonin, einem nichtionischen Tensid, welches Zellmembranen permeabilisiert, lysiert und durch Zentrifugation in eine cytosolische und eine Membranfraktion, welche u.a. Mitochondrien enthält, aufgetrennt. Das Zelllysate (L) sowie die Membran- (M) und Cytosolfractionen (C) wurden mittels Gelelektrophorese, Westernblot und anschließender Immunodetektion analysiert (Publikation 1 Abb. 1A). Dabei diente der α -F₁ α / β -Antikörper, der spezifisch die F₁-Untereinheit des Atmungskettenkomplexes V erkennt, als mitochondrialer, und α -Tubulin als cytosolischer Marker. Mit Hilfe der ISCA1-, ISCA2- und IBA57-spezifischen Antikörper ließen sich alle drei Proteine in der membranhaltigen Fraktion nachweisen, nicht jedoch im Cytosol. Um die zelluläre Lokalisation weiter einzugrenzen, wurden HeLa-Zellen mit jeweils einem Plasmid transfiziert, welches für ein Fusionsprotein aus einem der drei ISC-Faktoren und einem C-terminalen grün fluoreszierenden Protein (GFP) kodiert. Zusätzlich wurde ein Plasmid transfiziert, welches die Sequenz für eine Mitochondrien-gerichtete Variante des rot fluoreszierenden Proteins aus *Discosoma sp.* enthält (dsRedMito). Konfokale Mikroskopie lebender Zellen zeigte eine Überlappung der Signale für die ISCA1- und IBA57-Fusionsproteine mit dsRedMito (P1 Abb. 1B). Das ISCA2-Fusionsprotein war hingegen cytosolisch exprimiert. Im Hinblick auf die vorangegangene biochemische Analyse, welche keinen Nachweis für endogenes ISCA2 im Cytosol lieferte, ist hierbei jedoch von einem Expressionsartefakt auszugehen: So scheint es, dass nach Überexpression von ISCA2 nicht alle Moleküle in die Mitochondrien transportiert werden, bspw. aufgrund von Auslastung der Importmaschinerie, und daher im Cytosol verbleiben. Dieser Effekt tritt – in geringerem Maße – auch nach Überexpression einer

ungetaggt Variante des Proteins (smISCA2; P1 Abb. 3B) auf. In diesem Fall spricht die mittels Elektrophorese detektierte größere Variante von ISCA2 für ein Vorläuferprotein (preISCA2), welches erst nach Import in das Mitochondrium prozessiert wird. Zusammenfassend zeigte sich, dass ISCA1, ISCA2 und IBA57 ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert sind.

Zur Untersuchung der von ISCA1, ISCA2 und IBA57 ausgeübten Funktionen wurde ein Depletionsansatz mittels RNAi-Technologie in humaner Zellkultur gewählt. Hierfür wurde jeweils eine Kombination von siRNAs, die an verschiedenen Stellen der Ziel-mRNA binden, verwendet, um sowohl die Möglichkeit von unspezifischen, sog. off-target Effekten zu verringern, als auch die Depletionseffizienz zu verstärken. Um den Depletionseffekt weiter zu intensivieren, wurden transfizierte HeLa-Zellen für drei Tage in Kultur gehalten, anschließend geerntet und ein Teil der Zellen re-transfiziert. Diese Prozedur wurde nach weiteren drei Tagen noch einmal wiederholt. Der Einsatz der siRNAs bewirkte eine starke mRNA- und Proteindepletion von ISCA1, ISCA2 und IBA57 bereits nach der ersten Transfektion (P1 Abb. S1, Abb. 2). Bemerkenswert ist, dass die Verringerung von ISCA2 eine verstärkte Expression von ISCA1 zur Folge hatte, was als kompensatorischer Effekt gedeutet werden kann. Die Depletion von ISCA1 oder IBA57 hatte hingegen nur einen marginalen Effekt auf die Expression der jeweils anderen Proteine zur Folge, was möglicherweise an der im Vergleich zu ISCA2 schwächeren Depletion liegt.

Um unspezifische Effekte der RNAi-Technologie auszuschließen ist es üblich, in einem Teil der Zellen die Expression des zu depletierenden Proteins wiederherzustellen, was den Depletionsphänotyp vollständig komplementieren sollte. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zusätzlich zur siRNA mit einem Plasmid transfiziert, welches für das zu depletierende Protein kodierte, dessen mRNA-Produkt jedoch aufgrund von eingefügten stillen Mutationen (sm) in der DNA-Sequenz von der siRNA nicht erkannt wurde. Im Falle von IBA57 war das Einfügen stiller Mutationen nicht erforderlich, da die eingesetzte siRNA außerhalb des kodierenden Bereichs an die Ziel-mRNA band. Zunächst musste mittels Immunodetektion überprüft werden, ob die drei Plasmidprodukte smISCA1, smISCA2 und cIBA57 in ausreichendem Maße exprimiert wurden. smISCA1 war wie erwartet ausschließlich in den Mitochondrien und in vergleichbaren Mengen wie in Kontrollzellen detektierbar (P1 Abb. 3A). Auch smISCA2 war vorrangig in den Mitochondrien lokalisiert, wobei ein Teil des Proteins im Cytosol verblieb (P1 Abb. 3B). Aufgrund des langsameren Laufverhaltens dieser Proteinfraction während der Elektrophorese ist von einer unprozessierten Vorläuferform auszugehen (s. oben). Auch cIBA57 wurde ausschließlich in

Mitochondrien exprimiert, lag hier allerdings in deutlich größeren Mengen als endogenes IBA57 vor (P1 Abb. 3C).

Song und Kollegen hatten von einer cytosolischen Variante von ISCA1 und dessen Beteiligung an der Reifung cytosolischer/nukleärer Fe/S-Proteine berichtet (Song et al., 2009). Möglicherweise wird diese Variante in den Zellen in so geringen Mengen exprimiert, dass sie mit unseren Untersuchungsmethoden nicht nachzuweisen war. Um die Option eines cytosolischen ISCA1 dennoch untersuchen zu können, generierten wir ein Plasmid, das für eine Proteinvariante mit fehlender mitochondrialer Lokalisationssequenz kodiert (smISCA1 Δ MLS) und das folglich nur im Cytosol exprimiert sein sollte. Da ISCA1 und ISCA2 eine hohe Homologie aufweisen, war es denkbar, dass auch ISCA2 eine physiologisch aktive cytosolische Variante besitzt. Mit Hilfe von smISCA2 Δ MLS sollte in den folgenden Analysen auch diese Option berücksichtigt werden. Unerwarteterweise waren die Translationsprodukte weder von smISCA1 Δ MLS noch von smISCA2 Δ MLS im Cytosol detektierbar (P1 Abb. 3A+B), obgleich die entsprechenden mRNA-Produkte nachweisbar waren (P1 Abb. S1A+B). Erst die Hemmung der Proteindegradation durch Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132 führte zu einer Konzentrations-abhängigen Akkumulation der entsprechenden Proteine (P1 Abb. 3D). Diese Beobachtung ließ auf einen umgehenden proteasomalen Abbau beider Proteine im Cytosol schließen und war ein erster Hinweis darauf, dass eine physiologische Rolle dieser ISC-Faktoren im Cytosol unwahrscheinlich ist.

Nachdem die effiziente siRNA-vermittelte Depletion von ISCA1, ISCA2 und IBA57 überprüft wurde, sollten im Folgenden die physiologischen und funktionellen Auswirkungen dieser Defizienzen analysiert werden. Einen ersten Hinweis auf einen gestörten Zellmetabolismus lieferte der Vergleich der Farbe des Zellmediums der Kontrollzellen und der ISCA1-, ISCA2- oder IBA57-depletierten Zellen. Der Farbumschlag ins Gelbe zeigte eine Ansäuerung des Mediums an und war analog zur Depletionseffizienz bei den ISCA2-depletierten Zellen am stärksten ausgeprägt (P1 Abb. 4A). Ähnlich wie nach IND1-Depletion könnte die Azidifizierung auch im vorliegenden Fall durch eine erhöhte Lactatkonzentration im Kulturmedium infolge vermehrter anaerober Glycolyse begründet sein (Sheftel et al., 2009). Die Ansäuerung des Mediums ging einher mit schwerwiegenden morphologischen Veränderungen der Zellen. Vor allem ISCA1- und ISCA2-depletierte Zellen ließen im Lichtmikroskop große, vakuoläre Strukturen erkennen, die den Zellen ein schwammartiges Erscheinungsbild verliehen (P1 Abb. 4B). Eine genauere Untersuchung dieser Strukturen mittels Elektronenmikroskopie machte ihren Ursprung sichtbar: Trotz der enormen Größe und optischen Leere ließen sie sich durch die vorhandene Doppelmembran und Reste von Cristae eindeutig als Mitochondrien identifizieren (P1 Abb. 4C). Solche dramatischen

morphologischen Veränderungen sind typisch für Mitochondrien, in denen die Atmungskette beeinträchtigt ist. Der Verlust der Cristae wurde etwa in einigen anderen Fällen von mitochondrialen DNA-Mutationen beschrieben (Gdynia et al., 2010; Nass, 1984). Darüber hinaus führt die Depletion zumindest einiger Komponenten der ISC-Assemblierungsmaschinerie, wie etwa im Fall von NFS1 und IND1, zu strukturell veränderten Mitochondrien (Biederbick et al., 2006; Sheftel et al., 2009).

Studien in *S. cerevisiae*, *E. coli* und *T. brucei* hatten die Beteiligung der A-Typ ISC-Proteine und IBA57 an der Reifung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine ergeben (Long et al., 2011; Mühlenhoff et al., 2011; Tan et al., 2009). Um die Möglichkeit der Konservierung dieser Funktion im Menschen zu überprüfen, wurde die Funktionalität der ISC-Assemblierungsmaschinerie nach ISCA1-, ISCA2- oder IBA57-Depletion zunächst anhand Immunodetektion verschiedener mitochondrialer Fe/S-Proteine bewertet (P1 Abb. 5A). Der Atmungskettenkomplex I enthält in fünf seiner Untereinheiten insgesamt acht Fe/S-Cluster, wobei sechs vom [4Fe-4S]-Typ sind (Hirst, 2013). Die von uns getesteten Untereinheiten koordinieren zwar keinen Fe/S-Cluster, sind jedoch im peripheren Arm von Komplex I lokalisiert, dessen Bildung u.a. von der Reifung der Fe/S-haltigen Untereinheiten abhängt (Sheftel et al., 2009). Alle getesteten Untereinheiten dieses Komplexes waren in ISCA- und IBA57-defizienten Zellen stark verringert. Durch den Einsatz der entsprechenden Komplementierungskonstrukte erreichte die Expression von Komplex I sowie alle im Folgenden untersuchten Proteinlevel bzw. Enzymaktivitäten ganz oder zumindest teilweise das Niveau von Kontrollzellen (CTL), was auf die Spezifität der Depletionsansätze schließen ließ. Auch Komplex II (auch Succinatdehydrogenase (SDH) genannt), welcher drei Fe/S-Cluster ([2Fe-2S], [3Fe-4S] und [4Fe-4S]; (Sun et al., 2005)) besitzt, sowie die mitochondriale Aconitase (mitoAco) wiesen jeweils eine deutliche Depletion auf. Die Beeinträchtigung aller drei getesteten [4Fe-4S]-Proteine wurde unterstrichen durch eine entsprechend verringerte Enzymaktivität (P1 Abb. 5B+C). Das [4Fe-4S]-Protein LIAS generiert im Menschen den Lipoat-Kofaktor für vier Zielproteine: die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH), die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (α KGDH), die verzweigtkettige α -Ketosäure-Dehydrogenase, sowie das H-Protein des Glycinabbausystems (Mayr et al., 2011). Der Lipoat-Kofaktor der E2-Untereinheiten der PDH und α KGDH ließ sich nach ISCA1-, ISCA2- und IBA57-Depletion nicht mehr nachweisen, was auf eine eingeschränkte Funktionsweise der LIAS schließen ließ (P1 Abb. 5A). Interessanterweise war die [2Fe-2S]-Rieske-Untereinheit von Komplex III ebenfalls leicht depletiert, was möglicherweise auf den Zerfall des Atmungskettensuperkomplexes aufgrund der Beeinträchtigungen von Komplex I und II zurückzuführen ist (Dudkina et al., 2005; Schagger and Pfeiffer, 2000). Gegen einen

generellen Fe/S-Defekt in ISCA- und IBA57-depletierten Zellen spricht jedenfalls, dass die Ferrochelatase, welche den letzten Schritt der Hämbiosynthese katalysiert und einen [2Fe-2S]-Cluster trägt, in Proteinmenge und Aktivität unbeeinträchtigt blieb (P1 Abb. 5A+D). Komplex IV (auch Cytochrom-c-Oxidase, COX) ist kein Fe/S-Protein, besitzt jedoch zwei Häm a-Kofaktoren. Erstaunlicherweise waren sowohl der Proteinspiegel als auch die Katalyseaktivität von COX nach ISCA1-, ISCA2- und IBA57-Depletion stark verringert (P1 Abb. 5A+B). Dieser Effekt war zuvor bereits in Hefe beobachtet worden (Mühlenhoff et al., 2011). Die Beeinträchtigung von COX war nicht auf eine verminderte Bereitstellung der Häm-Kofaktoren zurückzuführen, da sowohl die Ferrochelatase als auch die Menge an zellulärem Häm nach ISCA- und IBA57-Depletion unverändert waren (P1 Abb. 5E). Dem COX-Defekt in ISCA- oder IBA57-defizienten HeLa- oder Hefe-Zellen scheint daher eine bisher unbekannte Ursache zugrunde zu liegen (s. Abschnitt 3).

Song und Kollegen hatten die Existenz einer cytosolischen Variante von ISCA1 und dessen Interaktion mit dem CIA-Faktor IOP1 postuliert (Song et al., 2009). Des Weiteren sprachen ihre Daten für eine direkte Rolle des cytosolischen ISCA1 für die Maturierung der cytosolischen Aconitase (cytoAco). Wir hatten eine cytosolische Lokalisierung weder von ISCA1, noch seiner funktionellen Partner ISCA2 und IBA57 nachweisen können (s. oben). Um den Einfluss der drei ISC-Faktoren auf die cytosolische Fe/S-Biogenese dennoch bewerten zu können, untersuchten wir entsprechend depletierte HeLa-Zellen hinsichtlich des Effekts auf die Maturierung cytosolischer Fe/S-Proteine. Die Stabilität der beiden cytosolischen [4Fe-4S]-Proteine Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPYD) und Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase (GPAT) hängt zwingend von der Inserierung des Fe/S-Kofaktors ab (Martelli et al., 2007; Schnackerz et al., 2004; Zhou et al., 1992). Durch eine Verringerung der Proteinlevel lässt sich dadurch direkt auf eine beeinträchtigte Fe/S-Proteinbiogenese schließen. Die Depletion weder von ISCA1, noch von ISCA2 oder IBA57 hatte einen Einfluss auf die Proteinspiegel von DPYD und GPAT (P1 Abb. 6A). Gleichermassen blieb die Expression von IRP1 unverändert. Allerdings war die katalytische Aktivität dieses Proteins, das bei Bindung eines Fe/S-Clusters als cytoAco agiert, in ISCA1- und ISCA2-depletierten Zellen beeinträchtigt (P1 Abb. 5B). Während die mitochondrialen smISCA-Proteine zur vollständigen Komplementierung der cytoAco-Aktivität führten, hatte die Expression der cytosolischen ISCA-Varianten (Δ MLS) hingegen keinen nennenswerten Einfluss auf diese Enzymaktivität. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass weder ISCA1 noch ISCA2 eine physiologische Rolle im Cytosol ausüben.

Der Verlust des Fe/S-Kofaktors bewirkt eine Konformationsänderung innerhalb der cytoAco, was die erhöhte Affinität des Apo-Proteins, nun IRP1 genannt, zu IREs bestimmter mRNAs bedingt (Volz, 2008). Analog zum Verlust der cytoAco-Enzymaktivität stieg die IRE-Bindeaktivität von IRP1 nach ISCA1- und ISCA2-Depletion stark an (P1 Abb. 6B). Dies hatte wiederum direkten Einfluss auf die Expression bestimmter an der Erhaltung der zellulären Eisenhomöostase beteiligter Proteine, da deren mRNAs entsprechende IREs aufweisen. So besitzt etwa die mRNA des Transferrin-Rezeptors (TfR) mehrere IREs im 3' untranslatierten Bereich, was die höhere Stabilität der mRNA nach IRP-Bindung bedingt. Hingegen führt die Bindung von IRPs an IREs im 5' untranslatierten Bereich, wie im Falle der für Ferritin (Ft) kodierenden mRNA, zu einer Behinderung der Translation. Wie im Hinblick auf die erhöhte IRP1-Bindeaktivität zu erwarten, wiesen ISCA1- und ISCA2-depletierte Zellen eine verstärkte Expression von TfR und einen verringerten Ft-Proteinspiegel auf (P1 Abb. 6A). Im Menschen gibt es ein zweites Eisenregulationsprotein, IRP2, welches keinen Fe/S-Cluster trägt. Bei ausreichender Verfügbarkeit von Eisen wird IRP2 unter Beteiligung der Eisen-abhängigen E3-Ubiquitinligase FBXL5 proteasomal abgebaut (Salahudeen et al., 2009; Vashisht et al., 2009). In ISCA- und IBA57-depletierten Zellen blieb die Expression von IRP2 weitestgehend stabil (P1 Abb. 6A). Generell hatte die Depletion von IBA57 keinen nennenswerten Effekt auf die zelluläre Eisenhomöostase, was möglicherweise an der im Vergleich zu ISCA1 und ISCA2 niedrigeren Depletionseffizienz von IBA57 liegt (s. oben).

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass die Funktion der A-Typ ISC-Proteine und von IBA57 von Bakterien über die Hefe bis hin zum Menschen in ihren Grundzügen konserviert ist: all diese Proteine sind essenziell für die Reifung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine. Entgegen der bisherigen Annahme werden ISCA1 und ISCA2 physiologisch nicht im Cytosol exprimiert und besitzen damit auch keine direkte Rolle bei der Reifung cytosolischer/nukleärer Fe/S-Proteine.

2.2 Eine Punktmutation im *IBA57*-Gen verursacht schwere Myopathie und Enzephalopathie im Menschen

Mutation of the iron-sulfur cluster assembly gene IBA57 causes severe myopathy and encephalopathy.

Ajit Bolar, Vanlander und Wilbrecht et al., Human Molecular Genetics, 2013

Die zwei Geschwister, die in dieser Studie vorgestellt werden, entstammten blutsverwandten Eltern marokkanischen Ursprungs und wiesen bereits im Mutterleib eine Wachstumsverzögerung sowie eine Microzephalie mit vergrößertem zerebellaren Ventrikelsystem auf. Direkt nach der Geburt litt das erste Kind (Patient 1) an schwerer Hypotonie, genereller Muskelschwäche und fehlender frühkindlicher Reflexe. Außerdem zeigte es Anzeichen einer Enzephalopathie (Publikation 2 Tabelle 1 und Abb. 1). Da die neonatale Intensivbehandlung keine Besserung des Zustands brachte, wurde die Therapie am sechsten Tag nach Geburt eingestellt. Das zweite Kind (Patient 2) war nach der Geburt stark hypotonisch. Auf Wunsch der Eltern wurde keine intensivmedizinische Behandlung eingeleitet und das Kind verstarb innerhalb von 15 Minuten nach der Geburt.

Untersuchungen der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) und des Blutes von Patient 1 ergaben eine Lactatazidose, welche einen Atmungskettendefekt nahelegte, sowie eine Hyperglycinämie, die auf eine beeinträchtigte Funktion der LIAS schließen ließ (P2 Tabelle 1). Die Bestimmungen des Hämatokrit, des Hämoglobins und der Erythrozytenzahl von Patient 1 ergaben hingegen keine Auffälligkeiten (P2 Tabelle S1). Zur detaillierteren Charakterisierung des Phänotyps wurden Skelettmuskel und kultivierte Hautfibroblasten beider Patienten hinsichtlich der Atmungskettenaktivität analysiert. Spektrophotometrische Untersuchungen beider Zelltypen ergaben eine verringerte Aktivität der Komplexe I und II, wohingegen Komplex III in beiden Patienten eine normale Aktivität aufwies (P2 Tabelle 2). Die Aktivität von Komplex IV war in Patient 1 leicht verringert. Durch weitere biochemische Messmethoden konnte dieses Ergebnis verifiziert werden: So zeigten auch in-gel Aktivitätsmessungen von Mitochondrien aus Skelettmuskel eine verringerte Aktivität von Komplex I und II, und im Falle von Patient 2 auch von Komplex IV (P2 Abb. 2A). Der gemessene Aktivitätsverlust ging einher mit stark reduzierten Proteinspiegeln der Komplexe I, II und IV in beiden Patienten (P2 Abb. 2B). Die Reduktion von Komplex II ließ sich ferner durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit anschließender Mikroskopie nachweisen:

Hierbei war das Signal für SDH (Komplex II) in den Mitochondrien beider Patienten im Vergleich zur Kontrolle stark vermindert (P2 Abb. 5J-R).

Aufgrund des ermittelten Atmungskettendefekts in Kombination mit den erhöhten Glycinwerten in Liquor und Serum wurde zunächst eine nichtketotische Hyperglycinämie vermutet. Diese Erkrankung führt aufgrund des hohen Glycinspiegels in Blut und Liquor, wo Glycin als hemmender Neurotransmitter wirkt, zu Muskelschwäche und Entwicklungsstörungen des Gehirns (Kikuchi et al., 2008). Die Molekularanalyse zweier bekanntermaßen mit der Krankheit in Verbindung stehender Gene (kodierend für die Glycin-Decarboxylase und die Aminomethyltransferase) ergab jedoch keine Mutationen in diesen Genen, woraufhin ein angeborener Defekt in der Fe/S-Biogenese vermutet wurde. Durch Homozygotie-Kartierung wurde schließlich die Punktmutation c.941A>C im *IBA57*-Gen identifiziert, welche zum Austausch eines Glutamins durch Prolin (p.Gln314Pro) führt. Beide Patienten waren homozygot für diese Mutation, und beide Elternteile sind heterozygote Träger (P2 Abb. 3). Interessanterweise liegt diese Mutation in einem nicht-konservierten Bereich von *IBA57*, sodass sich die Frage stellte, inwieweit die Mutation die Expression bzw. Funktionalität dieses ISC-Faktors beeinflusste. Durch Einsatz des *IBA57*-spezifischen Antikörpers stellten wir mittels Immunodetektion eine stark verringerte Expression von *IBA57* sowohl in Hautfibroblasten als auch im Skelettmuskel beider Patienten fest (P2 Abb. 4A). Die Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigte dieses Bild: Das Fluoreszenzsignal für *IBA57* in den Mitochondrien war für beide Patienten im Vergleich zu Kontrollzellen stark vermindert (P2 Abb. 5A-I). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die detektierte Punktmutation in *IBA57* zu einer direkten Minderung der Expression dieses ISC-Faktors führt. Damit ist es durchaus denkbar, dass ein mutiertes *IBA57* ursächlich für das biochemisch-klinische Erscheinungsbild beider Patienten war.

Die Beeinträchtigung der [4Fe-4S]-Cluster-tragenden Atmungskettenkomplexe I und II hatte bereits auf einen Fe/S-Defekt hingewiesen (s. oben). Nach Identifizierung der Mutation in *IBA57* sollte nun die Reifung eines weiteren [4Fe-4S]-Proteins bewertet werden. Das [4Fe-4S]-Protein LIAS liefert den Lipoat-Kofaktor u.a. an PDH und α KGDH (s. Abschnitt 2.1). In beiden *IBA57*-defizienten Patienten waren die Lipoat-haltigen E2-Untereinheiten sowohl von PDH als auch von α KGDH stark vermindert, was auf eine beeinträchtigte Funktion der LIAS schließen ließ (P2 Abb. 4B). Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass die normale Funktionsweise der ISC-Assemblierungsmaschinerie aufgrund der verringerten Proteinmenge des mutierten *IBA57* beeinträchtigt ist.

Diese Schlussfolgerung sollte unabhängig in einem RNAi-vermittelten Depletionsansatz in humaner Zellkultur überprüft werden. Hierfür depletierte ich IBA57 in HeLa-Zellen durch den Einsatz der entsprechenden siRNA (Sheftel et al., 2012), und verglich anschließend Wildtyp-IBA57 und mutiertes IBA57 (IBA57_Q314P) im Hinblick auf ihre jeweilige Funktionalität in einem Komplementierungsexperiment. Der Einsatz von siIBA57 bewirkte eine starke Depletion des Proteins (P2 Abb. 6A). Im Komplementationsansatz führte die Expression des Wildtyp-IBA57-kodierenden Plasmids zu Proteinmengen, die die des endogenen Proteins in Kontrollzellen weit überstieg, wohingegen die Transfektion mit vergleichbaren DNA-Mengen des IBA57_Q314P-kodierenden Plasmids nur eine zu Kontrollzellen vergleichbare IBA57-Expression zur Folge hatte. Die Depletion von IBA57 führte zu einer deutlichen Verminderung der Enzymaktivitäten der mitoAco, des Komplexes II (CII) und Komplexes IV (CIV) der Atmungskette (P2 Abb. 6B und (Sheftel et al., 2012)). Durch Expression von Wildtyp-IBA57 wurden die Enzymaktivitäten vollständig oder zumindest teilweise wiederhergestellt (P2 Abb. 6B). Die Expression von IBA57_Q314P hatte hingegen keinen nennenswerten Einfluss auf die drei untersuchten Enzyme. Die cytoAco wies nur eine geringfügige Einschränkung ihrer Aktivität nach IBA57-Depletion auf, welche weder durch Wildtyp- noch durch mutiertes IBA57 komplementiert werden konnte. Zusammenfassend zeigte sich, dass durch die Punktmutation in IBA57 keine normale Reifung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine erfolgen konnte.

Eine reduzierte Enzymaktivität aufgrund eines fehlenden Fe/S-Kofaktors geht oft mit einem entsprechend verringerten Proteinspiegel einher, da die Apo-Proteine aufgrund ihrer verringerten Stabilität schneller abgebaut werden. So zeigten die Komplexe II und IV eine Verringerung ihrer Proteinmenge (P2 Abb. 6C). Auch führte die IBA57-Depletion zu einer Verringerung des Lipoatgehalts der E2-Untereinheiten der PDH und der α KGDH. Die Auswirkung der IBA57-Depletion auf die genannten Proteine war sowohl durch Wildtyp-IBA57 als auch IBA57_Q314P komplementierbar, was für eine gewisse Restaktivität des mutierten Proteins spricht. Die Proteinlevel von Komplex I und der mitoAco zeigten hingegen keine Beeinträchtigung nach IBA57-Depletion, was evtl. auf die vergleichsweise schwache Depletionseffizienz nach RNAi-Behandlung zurückzuführen ist (s. Abschnitt 2.1 und (Sheftel et al., 2012)). Wie aus den Patientendaten erwartet, reiften die mitochondrialen [2Fe-2S]-Proteine Komplex III und Ferrochelatase unabhängig von IBA57. Auch die cytosolischen Fe/S-Proteine GPAT und IRP1 sowie IRP2 zeigten keine Expressionsdefizienz nach IBA57-Depletion. Die Ergebnisse legen nahe, dass IBA57 keinen Einfluss sowohl auf die Reifung mitochondrialer [2Fe-2S]-Proteine, als auch auf die cytosolische Fe/S-

Proteinbiogenese hat. Diese Schlussfolgerung wird gestützt durch die normale Reifung mitochondrialer [2Fe-2S]-Proteine in den Patienten.

Unsere Daten wiesen auf eine geringe Funktionalität des mutierten IBA57 hin, was die Frage aufwarf, worin die schweren Defekte in den IBA57-defizienten Patienten begründet lagen. Einen Hinweis lieferte uns die Tatsache, dass in den Patienten IBA57 nahezu nicht zu detektieren war (P2 Abb. 4A). Zum anderen hatten wir festgestellt, dass trotz des Einsatzes gleicher Mengen an Plasmid die Expression von Wildtyp-IBA57 wesentlich effizienter erfolgte als die des mutierten IBA57 (P2 Abb. 6A). Wir vermuteten daher einen Einfluss der Mutation auf die Stabilität des Proteins. Um diesen Sachverhalt zu prüfen, verwendete ich eine myc-getaggte Variante des mutierten IBA57 (IBA57_Q314P-myc) für die Transfektion in HeLa-Zellen. Durch die Behandlung der Zellen mit den Protease-Inhibitoren Pefabloc und MG132 akkumulierte IBA57_Q314P-myc sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig, während die Menge des endogenen IBA57 unbeeinflusst blieb (P2 Abb. 7A). Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass die Punktmutation in IBA57 tatsächlich eine verringerte Stabilität und die proteasomale Degradation des Proteins begünstigt. Um nun zu überprüfen, ob eine Hemmung des proteasomalen Abbausystems zu einer erhöhten Expression von IBA57_Q314P und damit zu einer verbesserten Fe/S-Proteinreifung führt, wurden Depletions- und Komplementierungsexperimente unter Verwendung des Protease-Inhibitors Pefabloc vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass zumindest der Depletionseffekt auf Komplex II durch mutiertes IBA57 nach Behandlung mit Pefabloc vollständig komplementiert werden konnte. Auch mitoAco sowie Komplex IV zeigten eine geringfügige, jedoch statistisch nicht signifikante Verbesserung ihrer Enzymaktivität (P2 Abb. 7B). Damit kann dem mutierten IBA57_Q314P eine gewisse Restfunktion zugesprochen werden.

In der vorliegenden Studie stellten wir zwei Patienten mit schwerer Enzephalomyopathie und perinataler Letalität vor. Das Krankheitsbild beruht auf einer Punktmutation im für IBA57 kodierenden Gen. Diese Mutation führte zu einem erhöhten proteasomalen Abbau des Proteins und beeinträchtigte dadurch die Funktionalität von IBA57 in der Fe/S-Proteinbiogenese. Dies betraf ausschließlich die Reifung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine. Hingegen waren die extramitochondriale Fe/S-Biogenese sowie die zelluläre Eisenhomöostase nicht beeinflusst. Durch die entsprechenden biochemischen Analysen der zwei Patienten war es uns möglich, die zuvor durch *in vitro* Studien in Hefe und humaner Zellkultur postulierte Rolle von IBA57 in der Biosynthese mitochondrialer [4Fe-4S]-Cluster zu bestätigen.

2.3 Eine Spleißmutation im *IBA57*-Gen verursacht eine besondere Form der erblichen spastischen Paraplegie

Fe/S Protein Assembly Gene IBA57 Mutation Causes Hereditary Spastic Paraplegia. Lossos, Stümpfig und Stevanin et al., wird veröffentlicht in Neurology

Diese Studie präsentiert eine blutsverwandte, fünf Generationen umspannende Familie palästinensisch-arabischen Ursprungs. Elf der lebenden betroffenen Mitglieder standen für die klinischen Untersuchungen zur Verfügung (Publikation 3 Abb. 1). Alle Patienten leiden an einer autosomal rezessiven Form der hereditären spastischen Paraplegie (HSP), wobei das Einsetzen sowie die Ausprägung der einzelnen Beschwerden zwischen den Familienmitgliedern variieren. Die wesentlichen klinischen Befunde sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Bereits in der Kindheit wiesen die Patienten eine leichte bis mittlere spastische Paraparese auf, die u.a. mit einer distalen Muskelatrophie des Beines und einem Hohlfuß einherging (P3 Abb. S3). Die gestörte Oberflächensensibilität in diesen Bereichen ließ eine periphere Neuropathie vermuten, die durch unterschiedliche neurologische Untersuchungen bestätigt wurde (P3 Tabelle 2). Im weiteren Verlauf der Kindheit manifestierte sich eine Atrophie des optischen Nervs, welche zu verringerter Sehschärfe und Gesichtsfeldausfällen führte (P3 Abb. S1+S2). In einigen Patienten entwickelte sich eine Atrophie bestimmter Gehirnareale wie des Kleinhirns, des Corpus Callosum und des Rückenmarks (P3 Abb. S4). Metabolische Werte wie der Aminosäuregehalt im Plasma, als auch die Glycin- und Lactatspiegel waren hingegen unauffällig. Die beschriebenen Symptome sind typisch für eine seltene Form der hereditären spastischen Paraplegie, welche charakterisiert ist durch die Kombination aus spastischer Paraplegie, optischer Atrophie und peripherer Neuropathie, und daher als SPOAN bezeichnet wird.

Um die Ursache für dieses Krankheitsbild zu finden, wurde eine genomweite Assoziationsstudie durchgeführt. Hierbei wurden 24 aufeinanderfolgende Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP von engl. single nucleotide polymorphism) innerhalb des Chromosoms 1 ermittelt, welche einen großen Bereich innerhalb dieses Chromosoms umfassen und daher die Sequenzierung des gesamten Exoms erforderlich machten. Letztlich wurde im *IBA57*-Gen die stille Mutation c.678A>G (p.Gln226Gln) identifiziert, welche das korrekte Spleißen der mRNA beeinträchtigt (P3 Abb. 2 A+B). Alle Patienten sind homozygot für diese Mutation.

Um die Folgen der gefundenen Mutation bewerten zu können, untersuchten wir mittels Gelelektrophorese die cDNA, die aus EBV-immortalisierten lymphoblastoiden

Zellen von Patient III-5 gewonnenen wurde. Der Vergleich mit Kontroll-cDNA ergab eine starke Bande mit einer Länge von 692 bp und eine schwächere Bande von 599 bp, die dem kalkulierten normalen Spleißprodukt entspricht (P3 Abb. 2C). Die Sequenzierung des längeren PCR-Produkts offenbarte die Beibehaltung von Intron 2, was zu einer Leserasterverschiebung in Exon 3 und einem vorzeitigen Stop-Codon führt. Die Translation der anormalen mRNA sollte theoretisch ein verkürztes Protein von 280 Aminosäuren (das Wildtyp-IBA57 besitzt 356 Aminosäuren) ergeben (P3 Abb. 2D).

Das Ergebnis der cDNA-Untersuchung deutete auf eine verminderte IBA57-Expression hin. Um diesen Verdacht zu prüfen, untersuchte ich Lymphoblastoidzellen von Patient III-5 und von vier Gesunden hinsichtlich der IBA57-Proteinmengen. Dabei zeigte sich, dass die Proteinmenge von IBA57 im Patienten nur bei etwa 10% der Menge von Gesunden lag (P3 Abb. 3A+B). Die stark verminderte Expression von IBA57 ließ eine eingeschränkte Fe/S-Proteinbiogenese vermuten. Tatsächlich zeigten die aus früheren Studien bereits bekannten [4Fe-4S]-Zielproteine von IBA57, die Atmungskettenkomplexe I und II, verringerte Proteinspiegel, die durch eine verminderte Enzymaktivität begleitet wurden (P3 Abb. 3A-D). Ebenso war der Lipoatgehalt der E2-Untereinheiten von PDH und α KGDH im Patienten verringert, wohingegen die Proteinmenge der E2-PDH-Untereinheit selbst leicht erhöht war (P3 Abb. 3A+B). Diese Beobachtung deutet auf eine Beeinträchtigung des [4Fe-4S]-Proteins LIAS hin. Die Proteinmengen des [2Fe-2S]-Proteins Komplex III, des Häm-haltigen Komplexes IV und des [4Fe-4S]-Proteins mitoAco waren im Patienten hingegen normal. Die cytoAco/IRP1 wies eine leichte Erhöhung des Proteinspiegels und eine damit verbundene schwache Aktivitätssteigerung auf, was möglicherweise einen kompensatorischen Effekt aufgrund der eingeschränkten mitochondrialen Fe/S-Biogenese darstellt.

Obwohl eine entsprechende mRNA im Patienten nachweisbar war, hatte ich mittels Immunodetektion keinen Hinweis auf das verkürzte IBA57 Protein in Lymphoidzellen des Patienten III-5 erhalten. Wir vermuteten daher einen raschen Abbau des verkürzten IBA57 Translationsprodukts. Um diesen Verdacht zu überprüfen, versetzte ich die Lymphoidzellen des Patienten mit den Protease-Inhibitoren Pefabloc und MG132. Mit Hilfe dieses Ansatzes hatte ich bereits die verstärkte proteolytische Degradation von IBA57 nachgewiesen, welche durch die Punktmutation p.Gln314Pro in IBA57 verursacht wurde (s. Abschnitt 2.2 und (Ajit Bolar et al., 2013)). Zur Überprüfung der Methode führte ich dieses Experiment noch einmal erfolgreich in der vorliegenden Studie durch (P3 Abb. S5B). In den Lymphoidzellen des Patienten III-5, die mit den beiden Protease-Inhibitoren behandelt wurden, akkumulierte hingegen

weder endogenes IBA57, noch trat eine Bande in Erscheinung, die dem verkürzten Protein entsprechen würde (P3 Abb. 5A). Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass die anormale mRNA gar nicht erst translatiert wird. Alternativ ist es denkbar, dass der eingesetzte polyklonale α -IBA57-Antikörper vor allem ein Epitop erkennt, welches im verkürzten IBA57 fehlt, was eine Detektion dieses Proteins unmöglich machen würde.

Durch die Analyse einer Familie mit hohem Anteil an Mitgliedern mit erblicher spastischer Paraplegie war es uns möglich, eine weitere krankheitsrelevante Mutation im *IBA57*-Gen zu identifizieren. Diese Mutation beeinträchtigt den normalen Spleißprozess der IBA57-mRNA und hat dadurch eine stark verringerte Expression des Proteins zur Folge. Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen perinatal letalen Enzephalomyopathie (Ajit Bolar et al., 2013), welche auf einem nahezu vollständigen Verlust von IBA57 beruht, verbleibt in den betroffenen Mitgliedern der palästinensisch-arabischen Familie jedoch eine signifikante Menge an funktionalem IBA57. Diese scheint die Biosynthese der mitochondrialen [4Fe-4S]-Proteine zu unterstützen, wenn auch die Effizienz im Vergleich zu Gesunden deutlich vermindert ist. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass dieser Expressionsunterschied der Grund für den vergleichsweise schwachen Fe/S-Proteindefekt und die dadurch bedingte leichtere Symptomatik der Patienten ist.

3. DISKUSSION

Die Reifung zellulärer Fe/S-Proteine wird durch einen hochkomplexen und stark konservierten Biogenesemechanismus gewährleistet. Die zentrale ISC-Assemblierungsmaschinerie vermittelt dabei die Bildung mitochondrialer [2Fe-2S]-Proteine. Für die Reifung von mitochondrialen [4Fe-4S]-Proteinen sind darüber hinaus noch eine Reihe weiterer ISC-Proteine essentiell. Zu diesen spät-agierenden Reifefaktoren gehören u.a. die A-Typ ISC-Proteine Isa1 und Isa2 in *S. cerevisiae*. Mehrere Studien in verschiedenen Modellorganismen belegen, dass sie ausschließlich an der Reifung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine beteiligt sind (Kaut et al., 2000; Long et al., 2011; Mühlenhoff et al., 2011; Pelzer et al., 2000; Tan et al., 2009). Das Folat-bindende Protein Iba57 weist in der Hefe die gleiche Spezifität wie die Isa-Proteine auf und interagiert auch physisch mit ihnen (Gelling et al., 2008). Trotz der fundierten Datenlage konnte man sich der funktionellen Konservierung der drei ISC-Faktoren Isa1, Isa2 und Iba57 jedoch nicht sicher sein, da funktionelle Studien zu ihren humanen Homologen bisher rar waren. Daher war eines der Ziele meiner Doktorarbeit, die funktionelle Rolle der humanen Proteine ISCA1, ISCA2 und IBA57 zu ermitteln.

Durch die Depletion von ISCA1, ISCA2 und IBA57 mittels RNAi-Technologie in HeLa-Zellen zeigten wir, dass diese Proteine für die Reifung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine benötigt werden. Dabei bewirkte die Depletion der untersuchten ISC-Faktoren eine Beeinträchtigung der Atmungskette und führte zu schweren morphologischen Veränderungen der Mitochondrien. Neben den Atmungskettenkomplexen I und II, die beide [4Fe-4S]-Cluster tragen, war auch der [2Fe-2S]-koordinierende Komplex III leicht betroffen. Möglicherweise ist dieser Effekt indirekt und dem starken Atmungskettendefekt sowie dem damit einhergehenden Zerfall der Atmungskettensuperkomplexe geschuldet (Dudkina et al., 2005; Schägger and Pfeiffer, 2000). Gegen einen generellen [2Fe-2S]-Defekt unter ISCA- und IBA57-Depletion spricht hingegen die unveränderte Aktivität des [2Fe-2S]-Proteins Ferrochelatase. Darüber hinaus zeigten auch Patienten mit verringerter IBA57-Expression keine Beeinträchtigung des Komplexes III (Ajit Bolar et al., 2013; Lossos et al., im Druck).

Durch ISCA- und IBA57-Depletion wurde weiterhin die Expression und Aktivität des Komplexes IV stark vermindert. Auch Patienten, in denen IBA57 praktisch nicht mehr nachzuweisen war, litten an einer verringerten Komplex IV-Aktivität (Ajit Bolar et al., 2013). Die Beeinträchtigung dieses Häm a-bindenden Enzyms lässt sich nicht durch die Verminderung der Komplexe I und II erklären, da bspw. bei IND1-Depletion, welche eine isolierte Komplex I-Defizienz bedingt, COX unbeeinträchtigt blieb (Sheftel et al., 2009). Wie bereits in Abschnitt 2.1 erwähnt, scheint die generelle Bereitstellung von

Häm in ISCA- und IBA57-depletierten Zellen nicht gestört zu sein. Auch eine beeinträchtigte Häm α -Synthese ist eher unwahrscheinlich, da hierfür das [2Fe-2S]-Protein Ferredoxin 2 (FDX2) benötigt wird. In der Hefe führte die Isa- oder Iba57-Depletion zu keiner Beeinträchtigung des Ferredoxins Yah1 und auch für das humane Homolog FDX2 ist dies nicht anzunehmen (Mühlenhoff et al., 2011; Sheftel et al., 2010b). Möglicherweise ist der beobachtete Effekt auf COX eher indirekter Natur, jedoch fehlt bisher eine molekulare Erklärung dieses von Hefe bis Mensch konservierten Effektes. Eine geschädigte Atmungskette geht mit einer verstärkten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species; ROS) einher (Moghaddas et al., 2003; Pitkänen and Robinson, 1996; Senoo-Matsuda et al., 2001), was wiederum die Anhäufung von Mutationen in der mitochondrialen DNA (mtDNA) begünstigt (Lee and Wei, 2007). Hefezellen, in denen Isa1 oder Isa2 depletiert war, wiesen einen Verlust der mtDNA auf (Kaut et al., 2000; Pelzer et al., 2000). Da drei Untereinheiten der COX auf der mtDNA kodiert sind (Soto et al., 2012), ist es denkbar, dass die Depletion der humanen ISCA- und IBA57-Proteine über einen Anstieg zellulären ROS letztlich die Expression von COX beeinträchtigt. Ebenso ist es möglich, dass ein bisher unbekanntes [4Fe-4S]-Protein, dessen Reifung von ISCA1, ISCA2 und IBA57 abhängen würde, direkt an der Maturierung von COX beteiligt ist. Um den Effekt auf COX durch ISCA- und IBA57-Depletion zufriedenstellend klären zu können, sind weitere Untersuchungen an ISCA/IBA57-depletierten humanen Zellen notwendig. Zur Beantwortung dieser Frage könnten auch Zellen der IBA57-defizienten Patienten herangezogen werden.

Die Depletion vor allem der ISCA-Proteine wies einen signifikanten Einfluss auf die zelluläre Eisenhomöostase auf, was mit einer verringerten Aktivität der cytoAco und entsprechend verstärkter IRP1-Bindeaktivität einherging. Dies wiederum hatte die Modulation der Expression eisenregulierender Proteine zur Folge. Da die cytoAco einen [4Fe-4S]-Cluster trägt, stellt sich die Frage, ob die ISCA-Proteine und IBA57 nicht doch einen Einfluss auf die cytosolische Fe/S-Biogenese haben. Dagegen spricht allerdings die Beobachtung, dass andere cytosolische [4Fe-4S]-Proteine, wie DPYD und GPAT, unabhängig von den ISCA-Proteinen und IBA57 maturiert werden. Weiterhin finden sich in Patienten mit stark eingeschränkter IBA57-Expression keine Anzeichen einer gestörten Eisenhomöostase (Ajit Bolar et al., 2013). Was also könnte den schwachen Maturierungsdefekt der cytoAco erklären? Entgegen der gewöhnlichen Koordination von [4Fe-4S]-Clustern mittels vier Cysteinresten werden im Falle der cytoAco lediglich drei Eisenionen an Cysteinreste gebunden, wohingegen das vierte Eisenion an Citrat bindet und dadurch die Isomerisierung zum Isocitrat katalysiert (Volz, 2008). Die damit einhergehende labile Bindung des Fe/S-Clusters an das Enzym

macht ihn daher besonders anfällig für Stressfaktoren wie die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (Wallander et al., 2006), wie sie bei einer beeinträchtigten Atmungskette auftreten können. Der beobachtete Effekt auf die cytoAco scheint damit eher indirekt zu erfolgen, und widerspricht nicht dem Befund, dass die Reifung cytosolischer Fe/S-Proteine ohne die Beteiligung der ISCA-Proteine und IBA57 stattfindet.

Entgegen einer früheren Studie (Song et al., 2009) fanden wir keinerlei Hinweise auf physiologisch aktive Varianten der ISCA-Proteine im Cytosol. Zum einen waren die endogenen Proteine ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert. Zum anderen wurden die Translationsprodukte, denen die mitochondriale Lokalisationssequenz fehlte, im Cytosol nicht stabil exprimiert und akkumulierten erst nach Proteasom-Inhibition. Von einer physiologischen Rolle dieser beiden Proteine in diesem Kompartiment ist daher nicht auszugehen.

Unsere Untersuchungen ergaben, dass die humanen Proteine ISCA1, ISCA2 und IBA57 ausschließlich an der Maturierung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine beteiligt sind, wohingegen die Reifung sowohl mitochondrialer [2Fe-2S] Proteine als auch extramitochondrialer Fe/S-Proteine unabhängig von diesen ISC-Faktoren erfolgt. Durch unsere Studien war es möglich, die konservierte Funktion der ISCA-Proteine und IBA57 als spät-agierende ISC-Reifefaktoren zu belegen. Sehr wahrscheinlich ist diese Funktion von Bakterien bis hin zum Menschen konserviert (Gelling et al., 2008; Vinella et al., 2009).

Eine bedeutsame Frage konnte bisher noch nicht zufriedenstellend beantwortet werden: Wie üben die ISCA-Proteine ihre Funktion auf molekularer Ebene aus? In beiden Proteinen wurden je drei Cysteinreste gefunden, die in allen Eukaryoten konserviert, und essenziell für die Funktionsweise der Hefeproteine Isa1 und Isa2 sind (Jensen and Culotta, 2000). Es wurde daraufhin vermutet, dass es sich bei diesen Cysteinresten um ein Eisen- oder Fe/S-Bindemotif handelt, das den Isa-Proteinen die Funktion eines Eisen- oder Fe/S-Lieferanten ermöglicht und ihre direkte Beteiligung an der Synthese des [4Fe-4S]-Clusters nahelegen würde. In mehreren unabhängigen *in vitro* Studien wurden A-Typ Proteine verschiedener Spezies in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt, und hinsichtlich der Bindung eines metallischen Kofaktors untersucht. Tatsächlich konnte bei allen die Bindung von Eisen nachgewiesen werden (s. S. 9 Übersichtsschema 2 rechts). Während Untersuchungen von *E. coli* und humanen A-Typ Proteinen auf mono-nukleäres Eisen als Kofaktor hinwiesen (Lu et al., 2010; Lu et al., 2008; Yang et al., 2006), legte die Analyse von A-Typ Proteinen aus *Azotobacter vinelandii* und *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) die Bindung von [2Fe-2S]- bzw. [4Fe-4S]-Cluster nahe (Krebs et al., 2001; Wu et al., 2002). Die bisher einzige

vorliegende *in vivo* Studie zur Eisenbindung der Isa-Proteine wurde in *S. cerevisiae* durchgeführt und zeigte wiederum die Bindung von mono-nukleärem Eisen an (Mühlenhoff et al., 2011). Neuere Untersuchungen liefern Hinweise auf die Frage, wie der Eisenkofaktor auf die A-Typ Proteine gelangen könnte. So belegten genetische Interaktionsstudien und bimolekulare *in vivo* Fluoreszenzkomplementation in *S. pombe* die Interaktion zwischen den Isa-Proteinen mit Grx5 (Kim et al., 2010). Weitere *in vitro* Studien zeigten dabei den gerichteten Transfer eines [2Fe-2S]-Clusters von Grx5 zu den A-Typ Proteinen (Banci et al., 2014; Mapolelo et al., 2013). Demnach binden die A-Typ Proteine einen [2Fe-2S]-Cluster und dienen als Plattform für die Generierung eines [4Fe-4S]-Clusters. Zum jetzigen Zeitpunkt bleibt allerdings die Frage nach dem formalen Mechanismus ungeklärt. So könnten die A-Typ Proteine molekulares Eisen liefern, das an den von ISCU2 transferierten [2Fe-2S]-Cluster geknüpft wird. Dies eröffnet die Frage nach der notwendigen zusätzlichen Sulfidquelle. Alternativ könnten die A-Typ Proteine genutzt werden, um direkt zwei [2Fe-2S]-Cluster zu einem [4Fe-4S]-Cluster zusammenzufügen. Hierzu würde sehr wahrscheinlich eine Reduktion notwendig sein. Für die endgültige Klärung dieser Fragestellung sind zukünftig weitere Untersuchungen notwendig. Diese Untersuchungen sollten in Abwesenheit von Dithiothreitol (DTT), einem artifiziellen Reduktionsmittel, erfolgen. Das Reagenz wurde bisher für *in vitro* Untersuchungen an A-Typ ISC-Proteinen verwendet. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass DTT den Reaktionsmechanismus verändern und artifiziell zur Bildung eines Fe/S-Clusters führen kann (Webert et al., 2014). Die physiologische Synthesereaktion wird wohl durch Zugabe von DTT umgangen.

Modellorganismen wie *E. coli* und *S. cerevisiae* oder auch die humane Zellkultur sind nützliche Systeme, um die Funktionen vieler humaner Proteine eingehend zu untersuchen. Dennoch handelt es sich bei diesen Modellen, wie der Name schon erkennen lässt, um artifizielle Systeme. Die mit ihrer Hilfe gewonnenen Erkenntnisse sollten somit nur mit der entsprechenden Vorsicht auf den Menschen übertragen werden. Für die Grundlagenforschung ist es daher von großem Nutzen, wenn Individuen ausfindig gemacht werden, bei welchen das Protein von Interesse durch einen genetischen Defekt funktionell beeinträchtigt ist und dadurch zu einem klinischen Krankheitsbild führt. Durch die klinische, klinisch-chemische und biochemische Analyse dieser Patienten ist es möglich, die im Modellsystem charakterisierte Funktion eines Proteins zu überprüfen und in Einklang mit dem vorhandenen Gendefekt zu bringen.

Die Identifizierung von zwei verschiedenen pathologischen Mutationen in *IBA57* eröffnete uns die Möglichkeit, die anhand von Untersuchungen an humanen Zellkulturen postulierte Rolle von IBA57 für die Fe/S-Proteinbiogenese zu verifizieren. Interessanterweise führten die beiden *IBA57* Mutationen zu gänzlich verschiedenen

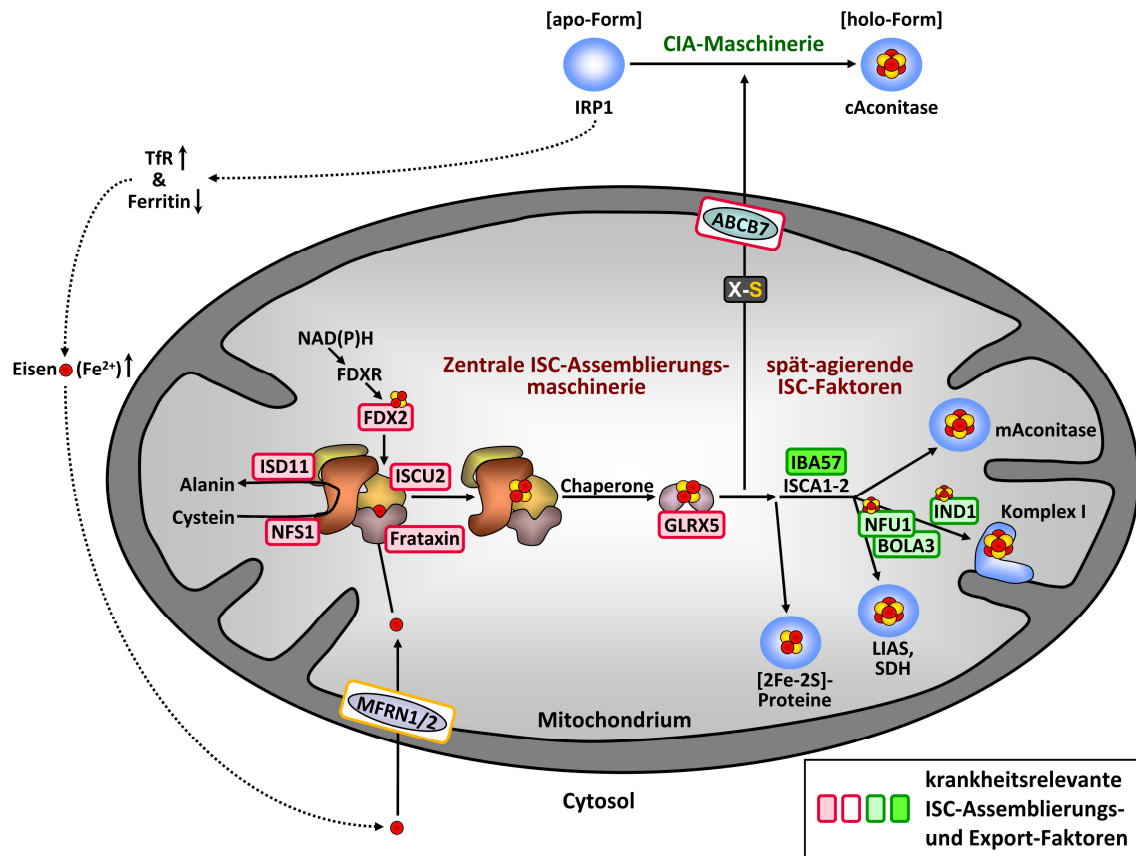
Krankheitsbildern. Die zwei in Belgien betreuten Kinder litten an schwerer Enzephalomyopathie, die nach der Geburt zum baldigen Tode führte. Hingegen verursacht die Mutation, die homozygot in mehreren Mitgliedern einer palästinensisch-arabischen Familie auftritt, eine besondere Form des SPOAN-Syndroms, welches durch neurologische Symptome wie spastischer Paraparese und optischer Atrophie gekennzeichnet ist, und den Betroffenen ein relativ normales Leben gewährt. Trotz der makroskopischen Unterschiede ähneln sich beide Erkrankungen auf biochemischer Ebene: In beiden Fällen war die Atmungskette durch Depletion der Komplexe I und II beeinträchtigt. Die in Belgien behandelten Patienten litten zudem an einem Komplex IV-Defekt. Darüber hinaus war in beiden Fällen die Funktion der LIAS vermindert, was sich zumindest bei den in Belgien betreuten Kindern in Form einer Hyperglycinämie bemerkbar machte. Auffällig war der generell höhere Schweregrad im biochemischen Phänotyp der in Belgien behandelten Patienten. Um diesen Sachverhalt zu verstehen, ist es erforderlich, einen genaueren Blick auf die Art der Mutationen in *IBA57* zu werfen. So bewirkt im Falle der palästinensisch-arabischen Familie die stille Mutation c.678A>G (p.Gln226Gln) die Bildung eines anormalen Spleißprodukts, welches wahrscheinlich nicht translatiert wird. Zusätzlich zu dieser Spleißvariante ist jedoch auch eine kleinere Menge an normal prozessierter mRNA in den Patienten vorhanden, was eine geringfügige Expression von *IBA57* ermöglicht. Im belgischen Fall hingegen führt die Punktmutation c.941A>C (p.Gln314Pro) zu einem annähernden Verlust des *IBA57*-Proteins, was durch verstärkten proteasomalen Abbau begründet ist. Somit ist es möglich, dass die durch die jeweiligen Mutationen verschiedenen zellulären *IBA57*-Proteinmengen ausschlaggebend für die graduellen Unterschiede im biochemischen Phänotyp beider Krankheitsbilder sind.

Leider steht zum jetzigen Zeitpunkt keine Kristallstruktur des humanen *IBA57* zur Verfügung, welche zur genaueren Bewertung der im belgischen Fall aufgetretenen Punktmutation herangezogen werden könnte. Da die Mutation nicht im konservierten Bereich liegt, wäre es interessant zu erfahren, ob und inwiefern ein Aminosäureaustausch an dieser Stelle die Proteinstruktur von *IBA57* ändern könnte. Das *E. coli* Homolog von *IBA57*, *YgfZ*, wurde vor einiger Zeit erfolgreich kristallisiert (Teplyakov et al., 2004). Für eine Strukturmodellierung von *IBA57* nutzten wir daher *YgfZ* und verwandte Strukturen als Vorlage. *YgfZ* ist in einem Bereich von 43 Aminosäuren zu 42% identisch mit *IBA57*; da beide Proteine jedoch ansonsten und gerade im Bereich der Mutation keine Konservierung aufweisen, sind Voraussagen bzgl. der Struktur von *IBA57* nur mit Vorsicht zu behandeln (Ajit Bolar et al., 2013). Laut unserer Analyse könnte Gln314 in einer Peptidschleife nahe der Proteinoberfläche liegen (unveröffentlichte Daten). Da Prolin bekanntermaßen die

Ausbildung von α -Helices beeinträchtigt, ist es denkbar, dass Gln314Pro zu einem Knick in der Peptidschleife führt (Kim and Kang, 1999; Kumar and Bansal, 1998). Die daraus resultierende Strukturänderung wiederum könnte den nachweislichen Abbau des mutierten Proteins durch das Proteasom zur Folge haben. Natürlich sind diese Überlegungen zu Gln314Pro aufgrund der großen Unsicherheit im Hinblick auf die Proteinstruktur des humanen IBA57 zurzeit nur spekulativer Natur. Es wäre daher wichtig, genaue Struktureinsichten in dieses ISC Protein zu erhalten.

IBA57 reiht sich ein in eine stetig wachsende Liste an humanen Krankheiten, die auf genetischen Defekten in den Mitgliedern der ISC-Assemblierungsmaschinerie beruhen (Übersichtsschema 3). Hierzu zählen neben IBA57 auch andere spät-agierende Reifefaktoren wie NFU1, BOLA3 und IND1. Obwohl diese vier ISC-Faktoren funktionell alle im späten Abschnitt der Fe/S-Proteinbiogenese angesiedelt sind, nämlich der Reifung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine, variieren die entsprechenden Krankheitsbilder doch erstaunlich stark. So bewirkt eine Punktmutation in *IND1*, welche in sechs Patienten von fünf nicht-verwandten Familien detektiert wurde, den vollständigen Verlust des Proteins und dadurch eine isolierte Komplex I-Defizienz (Kevelam et al., 2013). Diese führte in allen Fällen zu schweren Gehirnschädigungen u.a. der weißen Substanz und des Kleinhirns, was Ataxien und spastische Lähmungen zur Folge hatte. Im Gegensatz zu *IND1*, welches beim Menschen ausschließlich für die Reifung des Atmungskettenkomplexes I benötigt wird (Sheftel et al., 2009; Stehling et al., 2014), sind NFU1 und BOLA3 an der Maturierung sowohl der Atmungskettenkomplexe I und II als auch der LIAS beteiligt (Cameron et al., 2011; Haack et al., 2013; Navarro-Sastre et al., 2011). Vielleicht sind gerade wegen dieses breiteren Aufgabenspektrums im Vergleich zu *IND1* alle bisher identifizierten Mutationen in *NFU1* und *BOLA3* fatal. In zehn Patienten aus neun nicht-verwandten Familien wurde ein genetischer Defekt in *NFU1* ermittelt, welcher den kompletten Funktionsverlust des Proteins bedingt (Navarro-Sastre et al., 2011). Alle Kinder entwickelten sich im Mutterleib normal, wiesen jedoch nach der Geburt eine baldige Entwicklungsstörung und fortschreitende neurologische Beeinträchtigungen auf, und verstarben nach höchstens fünfzehn Monaten. Der Fall dreier Geschwister mit blutsverwandten Eltern ist noch dramatischer: Eine Spleißmutation führte zum totalen Verlust von NFU1 (Cameron et al., 2011). Trotz normaler Entwicklung im Mutterleib zeigten die Kinder kurz nach der Geburt eine Lactatacidose, verbunden mit zunehmender Schwäche und fehlender eigener Atmung, und verstarben spätestens einen Monat nach Geburt (Seyda et al., 2001). Verschiedene Mutationen in *BOLA3* führten jeweils zu erhöhten Glycinwerten im Serum und in der Cerebrospinalflüssigkeit. Aufgrund von Entwicklungsverzögerungen, Enzephalopathien und Krämpfen

verstarben die Patienten bereits im Säuglingsalter (Baker et al., 2014; Cameron et al., 2011; Haack et al., 2013; Seyda et al., 2001).



Übersichtsschema 3. Genmutationen in ISC-Assemblierungs- und Exportfaktoren führen zu humanen Erkrankungen. Bislang wurden elf ISC-Assemblierungs- und Exportfaktoren mit der Entwicklung humaner Erkrankungen in Verbindung gebracht. Dabei ist eine Zuordnung dieser Faktoren zu zwei phänotypischen Gruppen möglich: So führen Mutationen in Genen, die für die zentrale ISC-Assemblierungsmaschinerie kodieren (rot hinterlegt), zu Beeinträchtigungen sowohl der mitochondrialen als auch der cytosolischen Fe/S-Proteinbiogenese. Mutationen im mitochondrialen Transporter ABCB7 (roter Rahmen) behindern die Reifung cytosolischer/nukleärer Fe/S-Proteine. Aufgrund der beeinträchtigten CIA-Maschinerie gelangt u.a. die cytosolische Aconitase nicht zur Reifung. Stattdessen agiert die Apoform dieses Proteins als Eisenregulationsprotein IRP1. Dieses vermittelt eine verstärkte zelluläre Eisenaufnahme und –mobilisierung durch post-transkriptionelle Regulation des Transferrin-Rezeptors (TfR) und Ferritin. Letztlich führen diese Steuerungsprozesse zu einer mitochondrialen Eisenakkumulation. Im Gegensatz zu Mutationen in den zentralen ISC-Assemblierungsfaktoren sind Mutationen in Vertretern der spät-agierenden ISC-Faktoren (grün hinterlegt) ausschließlich mit einer gestörten Reifung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine verbunden, was keinen Einfluss auf die zelluläre Eisenhomöostase hat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der spät-agierende ISC-Reifefaktor IBA57 (grün hervorgehoben) als weiteres, nun elftes bekanntes Krankheits-assoziiertes Mitglied der ISC-Assemblierungs- und Export-Maschinerie identifiziert. MFRN1/2 (gelber Rahmen) gehört nicht direkt der ISC-Assemblierungsmaschinerie an, sondern fungiert als mitochondrialer Eisentransporter. Daher führen Mutationen in diesem Protein zu einer generellen Beeinträchtigung der zellulären Fe/S-Proteinbiogenese und der Hämbiosynthese. Modell adaptiert von (Stehling et al., 2014).

Diese Übersicht verdeutlicht, dass die mit diesen ISC-Faktoren assoziierten Krankheitsbilder vielfältiger Natur sein können, obwohl IBA57, NFU1, BOLA3 und IND1 alle als spät-agierende Reifefaktoren fungieren und sich ihre Substratspezifitäten teils sogar überschneiden. Ein gemeinsamer Nenner der variablen Krankheitsbilder scheinen zumindest die häufig auftretenden neurologischen Beeinträchtigungen des Gehirns zu sein. Über die Verbindung vom biochemischen zum klinischen Phänotyp lässt sich zurzeit nur spekulieren. So könnten neben Beeinträchtigungen der bereits identifizierten Fe/S-Zielproteine auch Maturierungsprobleme bei weiteren bisher unbekannten mitochondrialen Fe/S-Proteinen zur unterschiedlichen Symptomatik führen. Die natürlichen Expressionsunterschiede eines Proteins in verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers spielen eine wichtige Rolle für die Manifestation von Organ- oder Zelltyp-spezifischen Krankheitsbildern. So führt etwa die verringerte Expression des ABC Transporters ABCB7, welcher den Transport einer schwefelhaltigen Komponente aus den Mitochondrien in das Cytosol vermittelt, zur Akkumulation von Eisen in den Mitochondrien (Cavadini et al., 2007). Da ABCB7 vorrangig in hämatopoetischen und neurologischen Geweben exprimiert wird, ist die Ausbildung einer kombinierten Anämie/Ataxie in den betroffenen Patienten leicht nachzuvollziehen (Allikmets et al., 1999; Bekri et al., 2000; Stehling et al., 2014). Weiterhin sind gewebespezifische mRNA-Prozessierungen der ISC-Faktoren wie im Falle von ISCU2 (s. Einleitung) denkbar. Nicht zuletzt haben die aktuellen Fälle mit zwei unterschiedlichen Mutationen in *IBA57* gezeigt, dass je nach verbliebener Expressionseffizienz eines ISC-Reifefaktors unterschiedliche Organsysteme im Patienten betroffen sein können. Diese unterschiedliche Gewebespezifität bei verschiedenen Mutationen im selben Gen ist typisch für mitochondriale Erkrankungen dieser Art (Béniat et al., 2010).

Neben Erkrankungen, die durch Defekte in den spät-agierenden ISC-Reifefaktoren bedingt sind, sind seit Längerem Krankheiten bekannt, die auf Beeinträchtigungen der zentralen ISC-Assemblierungsmaschinerie beruhen (Übersichtsschema 3). Interessanterweise zeigt sich hierbei trotz einiger Ähnlichkeiten ein ganz anderes Krankheitsspektrum. Die bereits eingangs erwähnte speziell im Muskelgewebe verringerte Expression des Gerüstproteins ISCU2, aber auch der Verlust des Ferredoxins FDX2 in Muskel und Fibroblasten führen im Menschen zu Myopathien (Mochel et al., 2008; Olsson et al., 2008; Spiegel et al., 2014). Mutationen in *ISD11* und *NFS1* wurden hingegen in einigen Fällen mit Multiorganversagen im frühen Kindesalter in Verbindung gebracht und führten häufig zum Tode (Farhan et al., 2014; Lim et al., 2013). Bestimmte Formen von sideroblastischen Anämien beruhen auf Defekten des Glutaredoxins GLRX5 und des mitochondrialen Transporters ABCB7

(Allikmets et al., 1999; Bekri et al., 2000; Camaschella et al., 2007), wohingegen die Expressionsminderung von Frataxin und eine andere Mutation in *GLRX5* zu neurologischen Krankheitsbildern führen (Baker et al., 2014; Martelli et al., 2012).

Die Beeinträchtigung der zentralen ISC-Assemblierungsmaschinerie bedingt gleichermaßen einen Reifungsdefekt von mitochondrialen und cytosolisch-nukleären Fe/S-Proteinen. Dies lässt Gemeinsamkeiten, aber auch gravierende Unterschiede im biochemischen Phänotyp im Vergleich zu Mutationen später ISC-Reifefaktoren erwarten. So ist etwa die zelluläre Eisenhomöostase ausschließlich bei Mutationen der zentralen ISC-Assemblierungsmaschinerie gestört (s. unten). Im Gegensatz dazu führen Mutationen sowohl in zentralen als auch in spät-agierenden ISC-Reifefaktoren zu einem Verlust der LIAS-Aktivität. Dies spiegelt sich in verringerten Aktivitäten der PDH und α KGDH bspw. bei der FDX2-assoziierten Myopathie und bei einigen Fällen von Friedreich-Ataxie wieder (Blass et al., 1976; Melancon et al., 1979; Spiegel et al., 2014). Dennoch liegen bisher keine Berichte von einer damit verbundenen Anreicherung von Glycin im Serum und/oder der Cerebrospinalflüssigkeit der Patienten vor, wie dies häufig bei Defekten der spät-agierenden ISC-Reifefaktoren der Fall ist. Lediglich im Falle einer Deletionsmutation in *GLRX5* wurde eine Form der nicht-ketotischen Hyperglycinämie diagnostiziert (Baker et al., 2014), und generell weist das Krankheitsbild der betroffenen Patienten mehr Parallelen zu BOLA3- oder IBA57-assoziierten Erkrankungen auf als zu zentralen ISC-Krankheiten. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, das Auftreten der Hyperglycinämie in solchen Fällen zu Rate zu ziehen, in denen der ursächliche Faktor für eine Erkrankung bisher nicht bekannt ist. Denn während die typische nicht-ketotische Hyperglycinämie und die dadurch bedingten neurologischen Symptome wie Hypotonie, Apnoe und Krämpfe häufig auf Defekten der LIAS oder Komponenten des Glycin-spaltenden Systems beruhen (Baker et al., 2014; Kure et al., 2006; Mayr et al., 2011), kann eine Hyperglycinämie im Zusammenhang mit einem Atmungskettendefekt einen diagnostischen Hinweis auf eine Beeinträchtigung speziell der spät-agierenden ISC-Faktoren geben. Hierbei muss sicherlich berücksichtigt werden, dass sich Symptome wie die Hyperglycinämie nur bei entsprechend starker Funktionsbeeinträchtigung des betroffenen ISC-Faktors entwickeln.

Ein charakteristischer Befund bei Patienten mit Fe/S-Erkrankungen ist die Akkumulation von zellulärem Eisen. Interessanterweise erfolgt die Anreicherung dieses Metalls v.a. in den Mitochondrien (s. unten). Bisher wurde ein Anstieg mitochondrialen Eisens ausschließlich bei Beeinträchtigungen von Komponenten der zentralen ISC-Assemblierungsmaschinerie wie ISD11, ISCU2, Frataxin, und *GLRX5* sowie der ISC-Exportkomponente ABCB7 festgestellt (Delatycki et al., 1999; Haller et al., 1991; Lim et

al., 2013; Mochel et al., 2008). Im Gegensatz dazu weisen Patienten mit pathologischen Mutationen in Genen, die für spät-agierende Reifefaktoren kodieren, wie *IBA57* und *BOLA3*, eine normale (zelluläre) Eisenhomöostase auf, welche sich bspw. in unauffälligen Hämatokrit- und Hämoglobinwerten widerspiegelt (Ajit Bolar et al., 2013; Baker et al., 2014; Lossos et al., im Druck). Worin liegt dieser Unterschied begründet? Die zelluläre Eisenregulation in Säugern wird durch die cytosolischen Eisenregulationsproteine IRP1 und IRP2 vermittelt, wobei IRP1 durch die Bindung eines labilen Fe/S-Clusters als direkter Eisensensor tätig ist. Unter Eisen-limitierenden Bedingungen wird die Inserierung dieses Clusters nicht mehr gewährleistet, sodass die regulatorische Rolle von IRP1 für die Eisenhomöostase in den Vordergrund tritt (Volz, 2008). Die Funktion von IRP2 wird indirekt durch den zellulären Eisenstatus bestimmt, da die Menge dieses Proteins durch die Eisen-abhängige E3-Ubiquitinligase FBXL5 und den dadurch vermittelten proteasomalen Abbau reguliert wird (Salahudeen et al., 2009; Vashisht et al., 2009). Die Beeinträchtigung der zentralen mitochondrialen ISC-Assemblierungsmaschinerie suggeriert der humanen Zelle wegen der erhöhten IRP1-Menge ebenso einen Zustand der Eisenlimitierung. Dies erklärt sich aus der Tatsache, dass die cytosolische Fe/S-Proteinbiogenese an die zentrale ISC-Assemblierungsmaschinerie gekoppelt ist, und deshalb Beeinträchtigungen des mitochondrialen ISC-Systems auch zu verminderter Reifung cytosolischer Fe/S-Proteine wie der cytoAco führen (Übersichtsschema 3). Somit ist es leicht erklärbar, dass bei Erkrankungen, welche auf Defekten der zentralen ISC-Assemblierungsmaschinerie beruhen, die Aktivität v.a. von IRP1 erhöht ist (Camaschella et al., 2007; Mochel et al., 2008). Eine erhöhte Aktivität von IRP1 und ebenso von IRP2 bedingt die verminderte Expression des cytosolischen Eisenspeicher-Proteins Ferritin sowie die verstärkte Synthese des Transferrin-Rezeptors, welcher die zelluläre Aufnahme von Transferrin-gebundenen Eisen vermittelt (Camaschella et al., 2007). In der Summe führen diese Steuerungsprozesse zu einem Anstieg des zellulären Eisenspiegels, was die beobachteten erhöhten Eisenkonzentrationen in Patienten mit Mutationen in zentralen ISC-Faktoren zufriedenstellend erklärt.

Allerdings stellt sich die Frage, warum Erkrankungen, die mit Defekten in zentralen ISC-Faktoren assoziiert sind, durch eine Eisenakkumulation gerade in den Mitochondrien charakterisiert sind. Das Studium eines Mausmodells für Friedreich-Ataxie zeigte für diesen Umstand einen Lösungsansatz auf (Huang et al., 2009). Demnach spielen mehrere Faktoren zusammen: Zum einen wird durch eine beeinträchtigte Fe/S-Proteinbiogenese auch die Hämsynthese, für die das Fe/S-Protein Ferrochelatase essenziell ist, blockiert, wodurch die zwei größten Eisen-verwertenden

Systeme in den Mitochondrien ausfallen. Aufgrund verminderter Expression mitochondrialen Ferritins in diesem Mausmodell führt der Syntheseblock von Fe/S-Proteinen und Häm bereits zur Erhöhung des frei verfügbaren mitochondrialen Eisens. Des Weiteren wird, wie oben beschrieben, die Aktivität von IRP1/2 gesteigert, was zu einem verstärkten Eisentransport in die Zelle führt. Zuletzt weist die vermehrte Expression des mitochondrialen Transporters Mitoferrin 2 in diesem Modell auf einen gesteigerten Import von Eisen in die Mitochondrien hin. In der Summe tragen diese Faktoren im Mausmodell für Friedreich-Ataxie zur Eisenakkumulation in den Mitochondrien bei. Auch für andere humane Erkrankungen, die auf Defekten der zentralen ISC-Assemblierungsmaschinerie beruhen, ist dieser Zusammenhang denkbar.

Diese neuen Erkenntnisse können zur besseren Eingrenzung ungeklärter Mitochondriopathien als Folge von Störungen der Fe/S-Proteinbiogenese beitragen. All diese Erkrankungen sollten einen Atmungskettendefekt zumindest in den Komplexen I und II aufweisen. Aus dem Fehlen oder aber Vorhandensein einer zellulären bzw. mitochondrialen Eisenakkumulation sollte man einen Defekt in der späten oder der zentralen ISC-Assemblierungsmaschinerie vorhersagen können. Zusätzlich könnte der Nachweis eines LIAS-Defekts und der dadurch bedingten Hyperglycinämie zur Diagnose beitragen. Die Reifung der LIAS ist zwar von der zentralen ISC-Assemblierungsmaschinerie abhängig, gerade bei Defekten der späten ISC-Reifefaktoren jedoch führt eine beeinträchtigte LIAS-Funktion zu einer ausgeprägten Hyperglycinämie. Es ist denkbar, dass durch die gezielte Diagnose dieser Symptomatik zukünftig weitere pathologische Mutationen in bereits bekannten, krankheitsassoziierten ISC-Faktoren gefunden werden, oder auch Defekte in ISC-Faktoren aufgespürt werden, die bisher nicht mit humanen Erkrankungen in Verbindung gebracht wurden. In diesem Zusammenhang ist durchaus zu erwarten, dass auch ISCA1 oder ISCA2 in näherer Zukunft in den Fokus der Analysen geraten. Entsprechend zahlreicher Zellkulturdaten, die eine physische und funktionelle Interaktion von ISCA1/2 mit IBA57 nahelegen, wäre bei Mutationen in diesen Faktoren von einem ähnlichen Krankheitsbild, zumindest auf biochemischer Ebene, wie bei den IBA57-assoziierten Fällen auszugehen. Darüber hinaus bieten humangenetische Untersuchungen von Patienten mit einer Fe/S-assoziierten Mitochondriopathie die Möglichkeit, weitere, bisher unbekannte Faktoren, die an der zellulären Fe/S-Proteinbiogenese beteiligt sind, ausfindig zu machen. Klinische Untersuchungen könnten damit auch für den Grundlagenwissenschaftler von besonderem Interesse werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die humanen mitochondrialen Proteine ISCA1, ISCA2 und IBA57 mit Hilfe humaner Zellkultur als spät-agierende ISC-Assemblierungsfaktoren charakterisiert, wobei alle drei Proteine ausschließlich für die Reifung mitochondrialer [4Fe-4S]-Proteine erforderlich sind. Die Identifizierung zweier unabhängiger Patientengruppen mit unterschiedlichen Mutationen in *IBA57*, und der Vergleich des biochemischen Phänotyps der Patientenzellen mit den an Zellkulturen gewonnenen Daten ermöglichten es, die postulierte biochemische Rolle des humanen IBA57-Proteins zu bestätigen. Diese Arbeit ist daher beispielhaft für eine erfolgreiche Zusammenarbeit von Grundlagenwissenschaftlern und Klinikern. Auf der einen Seite hilft die Grundlagenforschung dem Arzt dabei, den (biochemischen) Phänotyp seiner Patienten besser zu verstehen bzw. vorauszusagen. Die klinisch-chemische Untersuchung dieser Patienten kann wiederum dazu beitragen, die experimentell definierte Funktion eines Proteins und seine funktionelle Einordnung in den Zellmetabolismus zu bestätigen oder aber zu widerlegen. Leider lässt sich aus den gewonnenen Daten zum jetzigen Zeitpunkt keine Therapie für die Betroffenen ableiten. Diese Problematik besteht bisher für viele mitochondriale Erkrankungen. Dennoch ist die eindeutige Identifizierung einer Mutation als Krankheitsursache von großem Nutzen für die betroffene Personengruppe, da dieses Wissen die humangenetische Beratung von Trägern dieser Mutation bei Kinderwunsch erleichtert.

4. Literaturverzeichnis

Adam, A. C., Bornhovd, C., Prokisch, H., Neupert, W., and Hell, K. (2006). The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *Embo J* 25, 174-183.

Ajit Bolar, N., Vanlander, A. V., Wilbrecht, C., Van der Aa, N., Smet, J., De Paepe, B., Vandeweyer, G., Kooy, F., Eyskens, F., De Lattre, E., et al. (2013). Mutation of the iron-sulfur cluster assembly gene IBA57 causes severe myopathy and encephalopathy. *Hum Mol Genet* 22, 2590-2602.

Allikmets, R., Raskind, W. H., Hutchinson, A., Schueck, N. D., Dean, M., and Koeller, D. M. (1999). Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum Mol Genet* 8, 743-749.

Armstrong, J. S., Khmour, O., and Hecht, S. M. (2010). Does oxidative stress contribute to the pathology of Friedreich's ataxia? A radical question. *Faseb J* 24, 2152-2163.

Baker, P. R., 2nd, Friederich, M. W., Swanson, M. A., Shaikh, T., Bhattacharya, K., Scharer, G. H., Aicher, J., Creadon-Swindell, G., Geiger, E., MacLean, K. N., et al. (2014). Variant non ketotic hyperglycinemia is caused by mutations in LIAS, BOLA3 and the novel gene GLRX5. *Brain* 137, 366-379.

Banci, L., Brancaccio, D., Ciofi-Baffoni, S., Del Conte, R., Gadepalli, R., Mikolajczyk, M., Neri, S., Piccoli, M., and Winkelmann, J. (2014). [2Fe-2S] cluster transfer in iron-sulfur protein biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 6203-6208.

Beinert, H., Holm, R. H., and Munck, E. (1997). Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277, 653-659.

Bekri, S., Kispal, G., Lange, H., Fitzsimons, E., Tolmie, J., Lill, R., and Bishop, D. F. (2000). Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood* 96, 3256-3264.

Bénit, P., El-Khoury, R., Schiff, M., Sainsard-Chanet, A., and Rustin, P. (2010). Genetic background influences mitochondrial function: modeling mitochondrial disease for therapeutic development. *Trends Mol Med* 16, 210-217.

Biederbick, A., Stehling, O., Rösser, R., Niggemeyer, B., Nakai, Y., Elsässer, H. P., and Lill, R. (2006). Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation. *Mol Cell Biol* 26, 5675-5687.

Blass, J. P., Kark, R. A., and Menon, N. K. (1976). Low activities of the pyruvate and oxoglutarate dehydrogenase complexes in five patients with Friedreich's ataxia. *N Engl J Med* 295, 62-67.

Bridwell-Rabb, J., Fox, N. G., Tsai, C. L., Winn, A. M., and Barondeau, D. P. (2014). Human frataxin activates Fe-S cluster biosynthesis by facilitating sulfur transfer chemistry. *Biochemistry* 53, 4904-4913.

- Bych, K., Kerscher, S., Netz, D. J., Pierik, A. J., Zwicker, K., Huynen, M. A., Lill, R., Brandt, U., and Balk, J. (2008). The iron-sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. *Embo J* 27, 1736-1746.
- Camaschella, C., Campanella, A., De Falco, L., Boschetto, L., Merlini, R., Silvestri, L., Levi, S., and Iolascon, A. (2007). The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* 110, 1353-1358.
- Cameron, J. M., Janer, A., Levandovskiy, V., Mackay, N., Rouault, T. A., Tong, W. H., Ogilvie, I., Shoubridge, E. A., and Robinson, B. H. (2011). Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. *Am J Hum Genet* 89, 486-495.
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M. D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., et al. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271, 1423-1427.
- Cavadini, P., Biasiotto, G., Poli, M., Levi, S., Verardi, R., Zanella, I., Derosas, M., Ingrassia, R., Corrado, M., and Arosio, P. (2007). RNA silencing of the mitochondrial ABCB7 transporter in HeLa cells causes an iron-deficient phenotype with mitochondrial iron overload. *Blood* 109, 3552-3559.
- Crooks, D. R., Jeong, S. Y., Tong, W. H., Ghosh, M. C., Olivierre, H., Haller, R. G., and Rouault, T. A. (2012). Tissue specificity of a human mitochondrial disease: differentiation-enhanced mis-splicing of the Fe-S scaffold gene ISCU renders patient cells more sensitive to oxidative stress in ISCU myopathy. *J Biol Chem* 287, 40119-40130.
- Delatycki, M. B., Camakaris, J., Brooks, H., Evans-Whipp, T., Thorburn, D. R., Williamson, R., and Forrest, S. M. (1999). Direct evidence that mitochondrial iron accumulation occurs in Friedreich ataxia. *Ann Neurol* 45, 673-675.
- Dudkina, N. V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E. J., and Braun, H. P. (2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3225-3229.
- Dupuy, J., Volbeda, A., Carpentier, P., Darnault, C., Moulis, J. M., and Fontecilla-Camps, J. C. (2006). Crystal structure of human iron regulatory protein 1 as cytosolic aconitase. *Structure* 14, 129-139.
- Farhan, S. M., Wang, J., Robinson, J. F., Lahiry, P., Siu, V. M., Prasad, C., Kronick, J. B., Ramsay, D. A., Rupar, C. A., and Hegele, R. A. (2014). Exome sequencing identifies NFS1 deficiency in a novel Fe-S cluster disease, infantile mitochondrial complex II/III deficiency. *Mol Genet Genomic Med* 2, 73-80.
- Garland, S. A., Hoff, K., Vickery, L. E., and Culotta, V. C. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* ISU1 and ISU2: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *J Mol Biol* 294, 897-907.
- Gdynia, G., Keith, M., Kopitz, J., Bergmann, M., Fassl, A., Weber, A. N., George, J., Kees, T., Zentgraf, H. W., Wiestler, O. D., et al. (2010). Danger signaling protein HMGB1 induces a distinct form of cell death accompanied by formation of giant mitochondria. *Cancer Res* 70, 8558-8568.

Gelling, C., Dawes, I. W., Richhardt, N., Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2008). Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Mol Cell Biol* 28, 1851-1861.

Gerber, J., Mühlenhoff, U., and Lill, R. (2003). An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep* 4, 906-911.

Haack, T. B., Rolinski, B., Haberberger, B., Zimmermann, F., Schum, J., Strecker, V., Graf, E., Athing, U., Hoppen, T., Wittig, I., et al. (2013). Homozygous missense mutation in BOLA3 causes multiple mitochondrial dysfunctions syndrome in two siblings. *J Inher Metab Dis* 36, 55-62.

Hall, R. E., Henriksson, K. G., Lewis, S. F., Haller, R. G., and Kennaway, N. G. (1993). Mitochondrial myopathy with succinate dehydrogenase and aconitase deficiency. Abnormalities of several iron-sulfur proteins. *J Clin Invest* 92, 2660-2666.

Haller, R. G., Henriksson, K. G., Jorfeldt, L., Hultman, E., Wibom, R., Sahlin, K., Areskog, N. H., Gunder, M., Ayyad, K., Blomqvist, C. G., and et al. (1991). Deficiency of skeletal muscle succinate dehydrogenase and aconitase. Pathophysiology of exercise in a novel human muscle oxidative defect. *J Clin Invest* 88, 1197-1206.

Harmer, J. E., Hiscox, M. J., Dinis, P. C., Fox, S. J., Iliopoulos, A., Hussey, J. E., Sandy, J., Van Beek, F. T., Essex, J. W., and Roach, P. L. (2014). Structures of lipoyl synthase reveal a compact active site for controlling sequential sulfur insertion reactions. *Biochem J* 464, 123-133.

Hirst, J. (2013). Mitochondrial complex I. *Annu Rev Biochem* 82, 551-575.

Hu, Y., and Ribbe, M. W. (2013). Nitrogenase assembly. *Biochim Biophys Acta* 1827, 1112-1122.

Huang, M. L., Becker, E. M., Whitnall, M., Suryo Rahmanto, Y., Ponka, P., and Richardson, D. R. (2009). Elucidation of the mechanism of mitochondrial iron loading in Friedreich's ataxia by analysis of a mouse mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16381-16386.

Huang X., Miller W. (1991). A time-efficient, linear space local similarity algorithm. *Advances in Applied Mathematics* 12, 337-357.

Jensen, L. T., and Culotta, V. C. (2000). Role of *Saccharomyces cerevisiae* ISA1 and ISA2 in iron homeostasis. *Mol Cell Biol* 20, 3918-3927.

Kaut, A., Lange, H., Diekert, K., Kispal, G., and Lill, R. (2000). Isa1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur proteins and requires conserved cysteine residues for function. *J Biol Chem* 275, 15955-15961.

Kevelam, S. H., Rodenburg, R. J., Wolf, N. I., Ferreira, P., Lunsing, R. J., Nijtmans, L. G., Mitchell, A., Arroyo, H. A., Rating, D., Vanderver, A., et al. (2013). NUBPL mutations in patients with complex I deficiency and a distinct MRI pattern. *Neurology* 80, 1577-1583.

Kikuchi, G., Motokawa, Y., Yoshida, T., and Hiraga, K. (2008). Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 84, 246-263.

- Kim, K. D., Chung, W. H., Kim, H. J., Lee, K. C., and Roe, J. H. (2010). Monothiol glutaredoxin Grx5 interacts with Fe-S scaffold proteins Isa1 and Isa2 and supports Fe-S assembly and DNA integrity in mitochondria of fission yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 392, 467-472.
- Kim, M. K., and Kang, Y. K. (1999). Positional preference of proline in alpha-helices. *Protein Sci* 8, 1492-1499.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., and Lill, R. (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *Embo J* 18, 3981-3989.
- Krebs, C., Agar, J. N., Smith, A. D., Frazzon, J., Dean, D. R., Huynh, B. H., and Johnson, M. K. (2001). IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis. *Biochemistry* 40, 14069-14080.
- Kumar, S., and Bansal, M. (1998). Geometrical and sequence characteristics of alpha-helices in globular proteins. *Biophys J* 75, 1935-1944.
- Kure, S., Kato, K., Dinopoulos, A., Gail, C., DeGrauw, T. J., Christodoulou, J., Bzduch, V., Kalmanchev, R., Fekete, G., Trojovsky, A., et al. (2006). Comprehensive mutation analysis of GLDC, AMT, and GCSH in nonketotic hyperglycinemia. *Hum Mutat* 27, 343-352.
- Lange, H., Kaut, A., Kispal, G., and Lill, R. (2000). A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1050-1055.
- Lee, H. C., and Wei, Y. H. (2007). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 232, 592-606.
- Li, J., Saxena, S., Pain, D., and Dancis, A. (2001). Adrenodoxin reductase homolog (Arh1p) of yeast mitochondria required for iron homeostasis. *J Biol Chem* 276, 1503-1509.
- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460, 831-838.
- Lill, R., Diekert, K., Kaut, A., Lange, H., Pelzer, W., Prohl, C., and Kispal, G. (1999). The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol Chem* 380, 1157-1166.
- Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem* 77, 669-700.
- Lim, S. C., Friemel, M., Marum, J. E., Tucker, E. J., Bruno, D. L., Riley, L. G., Christodoulou, J., Kirk, E. P., Boneh, A., DeGennaro, C. M., et al. (2013). Mutations in LYRM4, encoding iron-sulfur cluster biogenesis factor ISD11, cause deficiency of multiple respiratory chain complexes. *Hum Mol Genet* 22, 4460-4473.
- Long, S., Changmai, P., Tsaousis, A. D., Skalicky, T., Verner, Z., Wen, Y. Z., Roger, A. J., and Lukes, J. (2011). Stage-specific requirement for Isa1 and Isa2 proteins in the mitochondrion of *Trypanosoma brucei* and heterologous rescue by human and *Blastocystis* orthologues. *Mol Microbiol* 81, 1403-1418.
- Lu, J., Bitoun, J. P., Tan, G., Wang, W., Min, W., and Ding, H. (2010). Iron-binding activity of human iron-sulfur cluster assembly protein hlscA1. *Biochem J* 428, 125-131.

Lu, J., Yang, J., Tan, G., and Ding, H. (2008). Complementary roles of SufA and IscA in the biogenesis of iron-sulfur clusters in *Escherichia coli*. *Biochem J* 409, 535-543.

Mapolelo, D. T., Zhang, B., Randeniya, S., Albetel, A. N., Li, H., Couturier, J., Outten, C. E., Rouhier, N., and Johnson, M. K. (2013). Monothiol glutaredoxins and A-type proteins: partners in Fe-S cluster trafficking. *Dalton Trans* 42, 3107-3115.

Martelli, A., Napierala, M., and Puccio, H. (2012). Understanding the genetic and molecular pathogenesis of Friedreich's ataxia through animal and cellular models. *Dis Model Mech* 5, 165-176.

Martelli, A., Wattenhofer-Donze, M., Schmucker, S., Bouvet, S., Reutenauer, L., and Puccio, H. (2007). Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues. *Hum Mol Genet* 16, 2651-2658.

Mayr, J. A., Zimmermann, F. A., Fauth, C., Bergheim, C., Meierhofer, D., Radmayr, D., Zschocke, J., Koch, J., and Sperl, W. (2011). Lipoic acid synthetase deficiency causes neonatal-onset epilepsy, defective mitochondrial energy metabolism, and glycine elevation. *Am J Hum Genet* 89, 792-797.

Melancon, S. B., Potier, M., Dallaire, L., Rollin, P., Fontaine, G., and Grenier, B. (1979). Pyruvate dehydrogenase, lipoamide dehydrogenase and citrate synthase activity in fibroblasts from patients with Friedreich's and Charlevoix-Saguenay ataxia. *Can J Neurol Sci* 6, 241-242.

Mochel, F., Knight, M. A., Tong, W. H., Hernandez, D., Ayyad, K., Taivassalo, T., Andersen, P. M., Singleton, A., Rouault, T. A., Fischbeck, K. H., and Haller, R. G. (2008). Splice mutation in the iron-sulfur cluster scaffold protein ISCU causes myopathy with exercise intolerance. *Am J Hum Genet* 82, 652-660.

Moghaddas, S., Hoppel, C. L., and Lesnefsky, E. J. (2003). Aging defect at the QO site of complex III augments oxyradical production in rat heart interfibrillar mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 414, 59-66.

Mühlenhoff, U., Richter, N., Pines, O., Pierik, A. J., and Lill, R. (2011). Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *J Biol Chem* 286, 41205-41216.

Müller, M., and Martin, W. (1999). The genome of *Rickettsia prowazekii* and some thoughts on the origin of mitochondria and hydrogenosomes. *Bioessays* 21, 377-381.

Nass, M. M. (1984). Analysis of methylglyoxal bis(guanyldrazones)-induced alterations of hamster tumor mitochondria by correlated studies of selective rhodamine binding, ultrastructural damage, DNA replication, and reversibility. *Cancer Res* 44, 2677-2688.

Navarro-Sastre, A., Tort, F., Stehling, O., Uzarska, M. A., Arranz, J. A., Del Toro, M., Labayru, M. T., Landa, J., Font, A., Garcia-Villoria, J., et al. (2011). A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. *Am J Hum Genet* 89, 656-667.

Netz, D. J., Mascarenhas, J., Stehling, O., Pierik, A. J., and Lill, R. (2014). Maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Trends Cell Biol*.

Netz, D. J., Stith, C. M., Stumpfig, M., Kopf, G., Vogel, D., Genau, H. M., Stodola, J. L., Lill, R., Burgers, P. M., and Pierik, A. J. (2011). Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nat Chem Biol* 8, 125-132.

Nordin, A., Larsson, E., and Holmberg, M. (2012). The defective splicing caused by the ISCU intron mutation in patients with myopathy with lactic acidosis is repressed by PTBP1 but can be derepressed by IGF2BP1. *Hum Mutat* 33, 467-470.

Olsson, A., Lind, L., Thornell, L. E., and Holmberg, M. (2008). Myopathy with lactic acidosis is linked to chromosome 12q23.3-24.11 and caused by an intron mutation in the ISCU gene resulting in a splicing defect. *Hum Mol Genet* 17, 1666-1672.

Pandey, A., Gordon, D. M., Pain, J., Stemmler, T. L., Dancis, A., and Pain, D. (2014). Frataxin directly stimulates mitochondrial cysteine desulfurase by exposing substrate-binding sites, and a mutant Fe-S cluster scaffold protein with frataxin-bypassing ability acts similarly. *J Biol Chem* 288, 36773-36786.

Paradkar, P. N., Zumbrennen, K. B., Paw, B. H., Ward, D. M., and Kaplan, J. (2009). Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2. *Mol Cell Biol* 29, 1007-1016.

Pelzer, W., Mühlenhoff, U., Diekert, K., Siegmund, K., Kispal, G., and Lill, R. (2000). Mitochondrial Isa2p plays a crucial role in the maturation of cellular iron-sulfur proteins. *FEBS Lett* 476, 134-139.

Peters, J. W., and Broderick, J. B. (2012). Emerging paradigms for complex iron-sulfur cofactor assembly and insertion. *Annu Rev Biochem* 81, 429-450.

Pitkänen, S., and Robinson, B. H. (1996). Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J Clin Invest* 98, 345-351.

Qi, W., Li, J., and Cowan, J. A. (2014). A structural model for glutathione-complexed iron-sulfur cluster as a substrate for ABCB7-type transporters. *Chem Commun (Camb)* 50, 3795-3798.

Romberger, S. P., and Golbeck, J. H. (2010). The bound iron-sulfur clusters of type-I homodimeric reaction centers. *Photosynth Res* 104, 333-346.

Rötig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A., and Rustin, P. (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet* 17, 215-217.

Salahudeen, A. A., Thompson, J. W., Ruiz, J. C., Ma, H. W., Kinch, L. N., Li, Q., Grishin, N. V., and Bruick, R. K. (2009). An E3 ligase possessing an iron-responsive hemerythrin domain is a regulator of iron homeostasis. *Science* 326, 722-726.

Schaedler, T. A., Thornton, J. D., Kruse, I., Schwarzlander, M., Meyer, A. J., van Veen, H. W., and Balk, J. (2014). A conserved mitochondrial ATP-binding cassette transporter exports glutathione polysulfide for cytosolic metal cofactor assembly. *J Biol Chem* 289, 23264-23274.

Schägger, H., and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* 19, 1777-1783.

Schilke, B., Voisine, C., Beinert, H., and Craig, E. (1999). Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10206-10211.

Schmucker, S., Martelli, A., Colin, F., Page, A., Wattenhofer-Donze, M., Reutenauer, L., and Puccio, H. (2011). Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PLoS One* 6, e16199.

Schnackerz, K. D., Dobritsch, D., Lindqvist, Y., and Cook, P. F. (2004). Dihydropyrimidine dehydrogenase: a flavoprotein with four iron-sulfur clusters. *Biochim Biophys Acta* 1701, 61-74.

Senoo-Matsuda, N., Yasuda, K., Tsuda, M., Ohkubo, T., Yoshimura, S., Nakazawa, H., Hartman, P. S., and Ishii, N. (2001). A defect in the cytochrome b large subunit in complex II causes both superoxide anion overproduction and abnormal energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 276, 41553-41558.

Seyda, A., Newbold, R. F., Hudson, T. J., Verner, A., MacKay, N., Winter, S., Feigenbaum, A., Malaney, S., Gonzalez-Halphen, D., Cuthbert, A. P., and Robinson, B. H. (2001). A novel syndrome affecting multiple mitochondrial functions, located by microcell-mediated transfer to chromosome 2p14-2p13. *Am J Hum Genet* 68, 386-396.

Shan, Y., and Cortopassi, G. (2012). HSC20 interacts with frataxin and is involved in iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. *Hum Mol Genet* 21, 1457-1469.

Shan, Y., Napoli, E., and Cortopassi, G. (2007). Mitochondrial frataxin interacts with ISD11 of the NFS1/ISCU complex and multiple mitochondrial chaperones. *Hum Mol Genet* 16, 929-941.

Shaw, G. C., Cope, J. J., Li, L., Corson, K., Hersey, C., Ackermann, G. E., Gwynn, B., Lambert, A. J., Wingert, R. A., Traver, D., et al. (2006). Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature* 440, 96-100.

Sheftel, A., Stehling, O., and Lill, R. (2010a). Iron-sulfur proteins in health and disease. *Trends Endocrinol Metab* 21, 302-314.

Sheftel, A. D., Stehling, O., Pierik, A. J., Elsässer, H. P., Mühlenhoff, U., Webert, H., Hobler, A., Hannemann, F., Bernhardt, R., and Lill, R. (2010b). Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11775-11780.

Sheftel, A. D., Stehling, O., Pierik, A. J., Netz, D. J., Kerscher, S., Elsässer, H. P., Wittig, I., Balk, J., Brandt, U., and Lill, R. (2009). Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. *Mol Cell Biol* 29, 6059-6073.

Sheftel, A. D., Wilbrecht, C., Stehling, O., Niggemeyer, B., Elsässer, H. P., Mühlenhoff, U., and Lill, R. (2012). The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation. *Mol Biol Cell* 23, 1157-1166.

Shi, Y., Ghosh, M., Kovtunovych, G., Crooks, D. R., and Rouault, T. A. (2012). Both human ferredoxins 1 and 2 and ferredoxin reductase are important for iron-sulfur cluster biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1823, 484-492.

- Song, D., Tu, Z., and Lee, F. S. (2009). Human ISCA1 interacts with IOP1/NARFL and functions in both cytosolic and mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem* 284, 35297-35307.
- Soto, I. C., Fontanesi, F., Liu, J., and Barrientos, A. (2012). Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core. *Biochim Biophys Acta* 1817, 883-897.
- Spiegel, R., Saada, A., Halvardson, J., Soiferman, D., Shaag, A., Edvardson, S., Horovitz, Y., Khayat, M., Shalev, S. A., Feuk, L., and Elpeleg, O. (2014). Deleterious mutation in FDX1L gene is associated with a novel mitochondrial muscle myopathy. *Eur J Hum Genet* 22, 902-906.
- Srinivasan, V., Pierik, A. J., and Lill, R. (2014). Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter Atm1. *Science* 343, 1137-1140.
- Stehling, O., Wilbrecht, C., and Lill, R. (2014). Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie* 100, 61-77.
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., and Rao, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121, 1043-1057.
- Tan, G., Lu, J., Bitoun, J. P., Huang, H., and Ding, H. (2009). IscA/SufA paralogues are required for the [4Fe-4S] cluster assembly in enzymes of multiple physiological pathways in *Escherichia coli* under aerobic growth conditions. *Biochem J* 420, 463-472.
- Teplyakov, A., Obmolova, G., Sarikaya, E., Pullalarevu, S., Krajewski, W., Galkin, A., Howard, A. J., Herzberg, O., and Gilliland, G. L. (2004). Crystal structure of the YgfZ protein from *Escherichia coli* suggests a folate-dependent regulatory role in one-carbon metabolism. *J Bacteriol* 186, 7134-7140.
- Tong, W. H., and Rouault, T. A. (2006). Functions of mitochondrial ISCU and cytosolic ISCU in mammalian iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. *Cell Metab* 3, 199-210.
- Vashisht, A. A., Zumbrennen, K. B., Huang, X., Powers, D. N., Durazo, A., Sun, D., Bhaskaran, N., Persson, A., Uhlen, M., Sangfelt, O., et al. (2009). Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase. *Science* 326, 718-721.
- Vinella, D., Brochier-Armanet, C., Loiseau, L., Talla, E., and Barras, F. (2009). Iron-sulfur (Fe/S) protein biogenesis: phylogenomic and genetic studies of A-type carriers. *PLoS Genet* 5, e1000497.
- Volz, K. (2008). The functional duality of iron regulatory protein 1. *Curr Opin Struct Biol* 18, 106-111.
- Wallander, M. L., Leibold, E. A., and Eisenstein, R. S. (2006). Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* 1763, 668-689.
- Waller, J. C., Alvarez, S., Naponelli, V., Lara-Nunez, A., Blaby, I. K., Da Silva, V., Ziemak, M. J., Vickers, T. J., Beverley, S. M., Edison, A. S., et al. (2010). A role for tetrahydrofolates in the metabolism of iron-sulfur clusters in all domains of life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10412-10417.

Webert, H., Freibert, S. A., Gallo, A., Heidenreich, T., Linne, U., Amlacher, S., Hurt, E., Muhlenhoff, U., Banci, L., and Lill, R. (2014). Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nat Commun* 5, 5013.

White, M. F. (2009). Structure, function and evolution of the XPD family of iron-sulfur-containing 5'-->3' DNA helicases. *Biochem Soc Trans* 37, 547-551.

Wiedemann, N., Urzica, E., Guiard, B., Muller, H., Lohaus, C., Meyer, H. E., Ryan, M. T., Meisinger, C., Muhlenhoff, U., Lill, R., and Pfanner, N. (2006). Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *Embo J* 25, 184-195.

Wu, G., Mansy, S. S., Wu Sp, S. P., Surerus, K. K., Foster, M. W., and Cowan, J. A. (2002). Characterization of an iron-sulfur cluster assembly protein (ISU1) from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemistry* 41, 5024-5032.

Yang, J., Bitoun, J. P., and Ding, H. (2006). Interplay of IscA and IscU in biogenesis of iron-sulfur clusters. *J Biol Chem* 281, 27956-27963.

Zhang, B., Crack, J. C., Subramanian, S., Green, J., Thomson, A. J., Le Brun, N. E., and Johnson, M. K. (2012). Reversible cycling between cysteine persulfide-ligated [2Fe-2S] and cysteine-ligated [4Fe-4S] clusters in the FNR regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 15734-15739.

Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., and Dean, D. R. (1994). Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product. *Biochemistry* 33, 4714-4720.

Zhou, G., Broyles, S. S., Dixon, J. E., and Zalkin, H. (1992). Avian glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase propeptide processing and activity are dependent upon essential cysteine residues. *J Biol Chem* 267, 7936-7942.

5. Abkürzungsverzeichnis

cytoAco	cytosolische Aconitase
CIA	cytosolische Fe/S-Cluster-Assemblierung, engl. cytosolic Fe/S-protein assembly
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
COX	Cytochrom-c-Oxidase
CTL	Kontrolle, engl. control
DPYD	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
dsRedMito	Mitochondrien-gerichtete Variante des rot fluoreszierenden Proteins aus <i>Discosoma sp.</i>
E. coli	Escherichia coli
FDX	Ferredoxin
FDXR	Ferredoxinreduktase
Fe/S	Eisen/Schwefel
Ft	Ferritin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GLRX	Glutaredoxin
GPAT	Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase
HSP	hereditäre spastische Paraplegie
IRE	engl. iron-responsive element
IRP	Eisenregulationsprotein, engl. iron regulatory protein
ISC	Fe/S-Cluster, engl. iron sulfur cluster
α KGDH	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase
LIAS	Liponsäuresynthase, engl. lipoic acid synthase
MFRN	Mitoferrin
MLS	mitochondriale Lokalisationssequenz
mitoAco	mitochondriale Aconitase
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, engl. reactive oxygen species
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
S. pombe	Schizosaccharomyces pombe
SDH	Succinatdehydrogenase, Atmungskettenkomplex II
sm	still mutiert

SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen, engl. single nucleotide polymorphism
SPOAN	spastische Paraplegie, optische Atrophie und periphere Neuropathie
T. brucei	Trypanosoma brucei
TfR	Transferrin-Rezeptor

6. Anhang

6.1

MBoC | ARTICLE

The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation

Alex D. Sheftel^{a,b,*}, Claudia Wilbrecht^{a,*}, Oliver Stehling^a, Brigitte Niggemeyer^a, Hans-Peter Elsässer^a, Ulrich Mühlenhoff^a, and Roland Lill^a

^aInstitut für Zytobiologie, Philipps-Universität-Marburg, 35037 Marburg, Germany; ^bUniversity of Ottawa Heart Institute, Ottawa, ON K1Y 4W7, Canada

ABSTRACT Members of the bacterial and mitochondrial iron–sulfur cluster (ISC) assembly machinery include the so-called A-type ISC proteins, which support the assembly of a subset of Fe/S apoproteins. The human genome encodes two A-type proteins, termed ISCA1 and ISCA2, which are related to *Saccharomyces cerevisiae* Isa1 and Isa2, respectively. An additional protein, Iba57, physically interacts with Isa1 and Isa2 in yeast. To test the cellular role of human ISCA1, ISCA2, and IBA57, HeLa cells were depleted for any of these proteins by RNA interference technology. Depleted cells contained massively swollen and enlarged mitochondria that were virtually devoid of cristae membranes, demonstrating the importance of these proteins for mitochondrial biogenesis. The activities of mitochondrial [4Fe-4S] proteins, including aconitase, respiratory complex I, and lipoic acid synthase, were diminished following depletion of the three proteins. In contrast, the mitochondrial [2Fe-2S] enzyme ferrochelatase and cellular heme content were unaffected. We further provide evidence against a localization and direct Fe/S protein maturation function of ISCA1 and ISCA2 in the cytosol. Taken together, our data suggest that ISCA1, ISCA2, and IBA57 are specifically involved in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins functioning late in the ISC assembly pathway.

Monitoring Editor
Thomas D. Fox
Cornell University

Received: Sep 9, 2011
Revised: Dec 21, 2011
Accepted: Jan 30, 2012

INTRODUCTION

Owing to the ancient character (Huber *et al.*, 2003) of Fe/S clusters, homologues to the bacterial proteins dedicated to the formation of these cofactors are found in mitochondria of eukaryotes. In humans, Fe/S protein biogenesis (reviewed in Rouault and Tong, 2008, and Sheftel *et al.*, 2010a) is initiated in the mitochondria with the removal of sulfur from cysteine by the pyridoxal phosphate-dependent cysteine desulfurase complex Nfs1-Isd11. The persulfide intermediate must be further reduced to sulfide, which is probably accom-

plished through a ferredoxin electron transport system comprising ferredoxin reductase and ferredoxin 2 (Sheftel *et al.*, 2010b). Sulfide is then combined to form a [2Fe-2S] cluster with ferrous iron (Fe²⁺) on the scaffold protein IscU (Tong and Rouault, 2006). The molecular progression of nascent cluster transfer from IscU to target apoproteins has not been fully elucidated. However, the initial steps in this transfer require an Hsp70-based chaperone system (Knight *et al.*, 1998; Uhrigshardt *et al.*, 2010) and the monothiol Grx5 (Rodriguez-Manzanique *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2010). Components involved in the later dissemination of de novo assembled clusters to specific apoproteins are only beginning to be characterized.

Among other components of the Fe/S protein assembly, the *isc* and *suf* operons of bacteria encode the so-called A-type iron–sulfur cluster (ISC) proteins IscA and SufA, respectively, which are involved in the maturation of bacterial [4Fe-4S] proteins (Johnson *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2009). An additional member of this family, ErpA, is specifically involved in isoprenoid biosynthesis (Loiseau *et al.*, 2007). The molecular function of these proteins in Fe/S biogenesis has only been partially resolved, and some differing views have been proposed. Several reports suggest the A-type ISC proteins act as alternative scaffolds for de novo Fe/S cluster synthesis (Krebs *et al.*, 2001; Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2009), whereas

This article was published online ahead of print in MBoC in Press (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E11-09-0772>) on February 9, 2012.

*These authors contributed equally to the work.

Address correspondence to: Roland Lill (lill@staff.uni-marburg.de).

Abbreviations used: cAco, cytosolic aconitase; COX, cytochrome c oxidase; DPYD, dihydropyrimidine dehydrogenase; EM, electron microscopy; FC, ferrochelatase; GPAT, glutamate phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase; IRE, iron-responsive element; IRP, iron regulatory protein; ISC, iron-sulfur cluster; LDH, lactate dehydrogenase; mAco, mitochondrial aconitase; RNAi, RNA interference; SAM, S-adenosyl methionine; SDH, succinate dehydrogenase; UTR, untranslated region.

© 2012 Sheftel *et al.* This article is distributed by The American Society for Cell Biology under license from the author(s). Two months after publication it is available to the public under an Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>).

"ASCB®," "The American Society for Cell Biology®," and "Molecular Biology of the Cell®" are registered trademarks of The American Society of Cell Biology.

Supplemental Material can be found at:
<http://www.molbiolcell.org/content/suppl/2012/02/06/mbc.E11-09-0772.DC1.html>

Volume 23 April 1, 2012

1157

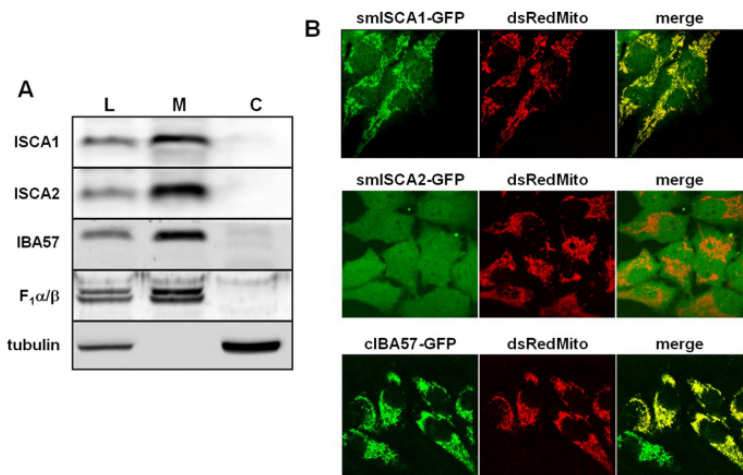


FIGURE 1: ISCA1, ISCA2, and IBA57 are localized to mitochondria. (A) HeLa cells were treated with digitonin and centrifuged at $15,000 \times g$ to separate the cell lysate (L) into a membrane fraction containing mitochondria (M) and a cytosolic fraction (C). Localization of ISCA1, ISCA2, and IBA57 was analyzed by immunoblotting using antibodies raised against the respective proteins. Antibodies recognizing the α and β subunits of F₁-ATP synthase (F₁α/β) and tubulin served to estimate the efficiency of separating mitochondrial and cytosolic proteins, respectively. (B) HeLa cells were cotransfected twice with smISCA1-GFP, smISCA2-GFP, or cIBA57-GFP, together with mitochondria-targeted *Discosoma* sp. red protein (dsRedMito). Images of living cells were acquired by confocal microscopy.

others show that these proteins can bind iron with high affinity and may deliver the metal to the IscU scaffold (Ding and Clark, 2004; Ding et al., 2005; Wang et al., 2010; Lu et al., 2010).

Eukaryotes contain two A-type ISC proteins with conserved features in their primary structure, yet studies in yeast show that they perform nonredundant functions essential for respiratory growth (Jensen and Culotta, 2000; Kaut et al., 2000; Pelzer et al., 2000; Mühlenhoff et al., 2011). Only yeast *Isc1*, but not *Isc2*, can be replaced by the bacterial A-type ISC proteins. Yeast *Isc1* and *Isc2* are required for efficient maturation of the Fe/S proteins aconitase and succinate dehydrogenase (SDH). In addition, both of these proteins have been suggested to function in maintaining the activity of the radical SAM enzyme biotin synthase, even though they are dispensable for the incorporation of Fe/S clusters into the enzyme (Mühlenhoff et al., 2007). The human genome contains the *Isc1* and *Isc2* relatives ISCA1 and ISCA2, respectively. ISCA1 was recently shown to interact with IOP1 (also known as NARFL, the homologue to yeast *Nar1*) in a yeast two-hybrid screen (Song et al., 2009). Consequently, the same study implicated ISCA1 not only in mitochondrial, but also in cytosolic Fe/S protein production by showing a decrease in cytosolic aconitase (cAco; also known as iron-regulatory protein 1 [IRP1]) upon RNA interference (RNAi)-mediated ISCA1 depletion. In contrast, *Isc1* and *Isc2* from *Trypanosoma brucei* were recently shown to be required for the assembly of Fe/S clusters in mitochondrial but not cytosolic Fe/S proteins (Long et al., 2011). Yeast *Isc1* and *Isc2* function in concert with *Iba57*, which physically interacts with them (Gelling et al., 2008). Yeast cells depleted or devoid of *Iba57* show virtually the same growth phenotypes and functional defects in Fe/S proteins as *Isc1*- or *Isc2*-deficient cells (Gelling et al., 2008). Furthermore, *Escherichia coli* cells devoid of an *Iba57*-related protein display defects in a subset of Fe/S proteins (Waller et al., 2010).

In an *in silico* gene expression analysis screen for human and mouse genes affecting heme biosynthesis, Nilsson et al. (2009) identified IBA57 and ISCA1, raising the question of whether these proteins function in heme biosynthesis or Fe/S cluster biogenesis. Targeted knockdown of these genes in zebrafish resulted in anemia. Of interest, previous studies demonstrated that deficiencies in two proteins of Fe/S protein biogenesis, ABCB7 (Allikmets et al., 1999) and GLRX5 (Wingert et al., 2005; Camaschella et al., 2007), can result in erythropoietic defects, indicating a connection between Fe/S protein synthesis and hemoglobin production. Because both these processes are relevant for several human diseases (Sheftel et al., 2010a; Ye and Rouault, 2010b), we attempted to better understand the physiological function of human ISCA1, ISCA2, and IBA57. We examined whether these proteins are directly involved in mitochondrial and cytosolic Fe/S protein biogenesis and/or in heme synthesis. Localization studies in HeLa cells identified these proteins in mitochondria. ISCA1 and ISCA2 were found to be required for the maturation of all tested mitochondrial [4Fe-4S] proteins, including the radical SAM enzyme lipoic acid synthase, whereas the [2Fe-2S] protein ferredoxin and heme biosynthesis were unaffected. Cells deficient in IBA57 exhibited a similar phenotype to ISCA1- or ISCA2-depleted cells. Thus our study identifies these three proteins as members of the mitochondrial ISC assembly machinery. They perform a specific task late in the biosynthetic pathway of mitochondrial [4Fe-4S] proteins.

RESULTS

ISCA1, ISCA2, and IBA57 are localized to mitochondria

To determine the subcellular localization of ISCA1, ISCA2, and IBA57, specific antibodies were raised in rabbits. HeLa cells were fractionated by lysis with digitonin into a membrane pellet containing mitochondria and a cytosolic supernatant. Immunoblotting identified all three ISC proteins exclusively in the membrane pellet (Figure 1A, lane M). The α and β subunits of mitochondrial F₁ ATP synthase (F₁α/β) and cytosolic tubulin served as markers for efficient fractionation. To further corroborate these localization data by an alternative experimental approach, we cotransfected HeLa cells with plasmids encoding C-terminally enhanced green fluorescent protein (EGFP)-tagged versions of ISCA1 (psmISCA1-GFP), ISCA2 (psmISCA2-GFP), or IBA57 (pciBA57-GFP). As a control, a construct encoding mitochondria-targeted dsRed protein (pDsRed2-Mito) was cotransfected. In the cases of ISCA1 and IBA57, a vast majority of the green fluorescence was seen in mitochondria, colocalizing with the dsRed signal (Figure 1B). In contrast, smISCA2-GFP was present throughout the cells. This result is contradictory to the immunoblotting data and is likely due to a mislocalization of the protein due to either overexpression and/or GFP tagging. In support of this idea, when immunoblots from cells overexpressing psmISCA2-GFP were analyzed, a more slowly migrating band, probably representing the unprocessed precursor form of ISCA2-GFP, was present in cytosolic fractions (see discussion and Figure 3B, lane

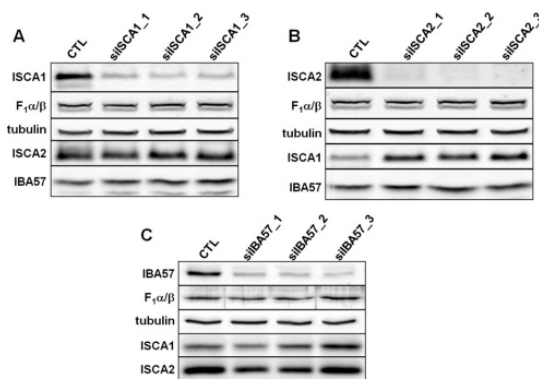


FIGURE 2: RNAi depletion of ISCA1, ISCA2, or IBA57 and the effects on the corresponding partner proteins. HeLa cells were transfected with (A) siSCA1, (B) siSCA2, or (C) siIBA57. Cells were harvested after 3 d of growth, and a fraction of the cells was retransfected. This procedure was performed twice. Cell lysates of all three transfection rounds (1–3) and of mock-transfected control cells (CTL) were examined by immunoblotting to compare respective protein levels of ISCA1, ISCA2, and IBA57. Immunostaining against F₁α/β and tubulin served as loading controls.

11, later in the paper), indicating a hampered import into mitochondria upon overexpression. We conclude that all three ISC proteins are located in mitochondria.

RNAi-mediated depletion of ISCA and IBA57 proteins results in altered cell metabolism and abnormal mitochondrial ultrastructure

To analyze the physiological consequences of a deficiency in ISCA1, ISCA2, or IBA57, we used RNAi technology. Repeated electroporation-mediated transfection with small interfering RNA (siRNA) duplexes efficiently depleted both ISCA1, ISCA2, and IBA57 mRNAs (Supplemental Figure S1) and proteins (Figure 2) relative to control cells, whereas the levels of mitochondrial and cytosolic control proteins remained unchanged. Of interest, depletion of ISCA2—the protein most strongly affected by RNAi treatment in comparison to ISCA1 and IBA57—resulted in a concurrent increase in ISCA1 protein (Figure 2B). Similarly, depletion of ISCA1 resulted in an increase of ISCA2 levels, although one that was less pronounced as in the previous case (Figure 2A). Compared to ISCA1 and ISCA2, the depletion of IBA57 was relatively weak (Figure 2C). Only one of five tested siRNA sequences yielded a substantial depletion of IBA57. Nonetheless, a modest increase in ISCA1 levels was observed in cells depleted of IBA57 (Figure 2C).

The depletion of the ISCA and IBA57 proteins allowed us to analyze the physiological and functional consequences of their deficiencies. To control for the specificity of the observed effects, we first generated rescue constructs that express RNAi-resistant versions of the ISCA and IBA57 proteins. In the cases of ISCA1 and ISCA2, silent mutations were introduced into the regions targeted by the various siRNAs to generate the plasmids psmISCA1 and psmISCA2. For IBA57, only one siRNA sequence, whose target resided in an untranslated region of the mRNA, was used. Therefore no mutagenesis was needed to generate the rescue construct pclIBA57. Figure 3 shows the relative expression levels from these constructs in cells (lysate) after three transfections as detected by immunostaining with specific antibodies. The amount of plasmid-expressed

smISCA1 was slightly lower than that of the endogenous protein, whereas smISCA2 and clIBA57 levels exceeded native levels of ISCA2 and IBA57, respectively. All plasmid-expressed proteins were exclusively localized to mitochondria, and no mature-sized products were detectable in the postmitochondrial supernatants (Figure 3). As already mentioned, we observed a weak band possibly corresponding to an unprocessed form of ISCA2 (Figure 3B, lane 11). To allow the investigation of the role of potentially cytosol-localized ISCA1 and ISCA2 by a functional complementation approach, we further transfected RNAi-treated HeLa cells with plasmids psmISCA1^{ΔMLS} and psmISCA2^{ΔMLS}, which led to overexpression of these proteins without their mitochondrial localization sequences. Successful production of the respective mRNAs was confirmed by quantitative real-time PCR (Supplemental Figure S1, A and B). In contrast to previously reported results (Song *et al.*, 2009), deletion of the mitochondrial presequence of ISCA1 did not yield any detectable protein in either the postmitochondrial supernatant or the mitochondria, even when the cells were immediately trichloroacetic acid precipitated after harvesting (Figure 3A). This was also the case for truncated ISCA2. We speculate that these proteins are nonfunctional in the cytosol and thus may be efficiently degraded. This expectation was confirmed by inhibiting the proteasome with MG132 during growth of HeLa cells expressing the cytosolic versions of the ISCA proteins. Under these conditions, significant amounts of both ISCA proteins were detectable in the cell lysates (Figure 3D). The proteasomal degradation of the ISCA proteins in the cytosol argues against their function in this compartment.

Following ISCA1 or ISCA2 depletion, we observed an acidification of the cell culture media, likely indicating a defect in respiratory function (Figure 4A; Sheftel *et al.*, 2009). This was accompanied by a gross alteration in intracellular morphology manifested as large, vacuolar structures, giving the cells a spongiform appearance (Figure 4B). Because these structures seemed to resemble lipid droplets, we attempted to stain them with Sudan dyes (Lison and Dagnelie, 1935; Jones, 2008). No positive staining resulted in these experiments (unpublished data). We therefore examined the cells using transmission electron microscopy (EM). The ultrastructural analysis revealed that the large inclusions represented severely enlarged mitochondria (some measuring >5 μm in diameter; Figure 4C). No medium acidification and no gross microscopic alterations were observed for the IBA57-depleted cells; however, the EM analysis nonetheless revealed mitochondria that were generally deficient in cristae membranes (Figure 4C). This comparatively modest phenotype is consistent with the weaker depletion of IBA57 and with the less severe metabolic defects in the IBA57-deficient cells (see later discussion). Of importance, the ultrastructural alterations could be fully reversed by expression of a plasmid-encoded, RNAi-resistant ISCA or IBA57 protein, demonstrating the specificity of these effects. Together these data suggest that the ISCA and IBA57 proteins are required for the maintenance of normal mitochondrial morphology, especially for the formation of cristae membranes.

ISCA and IBA57 protein depletion decreases mitochondrial Fe/S protein levels and enzyme activities

Defects in cristae membranes are characteristic for respiration-compromised mitochondria. Hence it seemed likely that the depletion of ISCA and IBA57 proteins elicited functional defects in cellular respiration. In human cells, the apoprotein levels of many Fe/S proteins are diminished when cells are unable to generate Fe/S clusters. These changes are detectable by immunoblotting. Therefore we examined the amounts of several Fe/S proteins after depletion of the ISCA or IBA57 proteins (Figure 5A). With the notable exception of

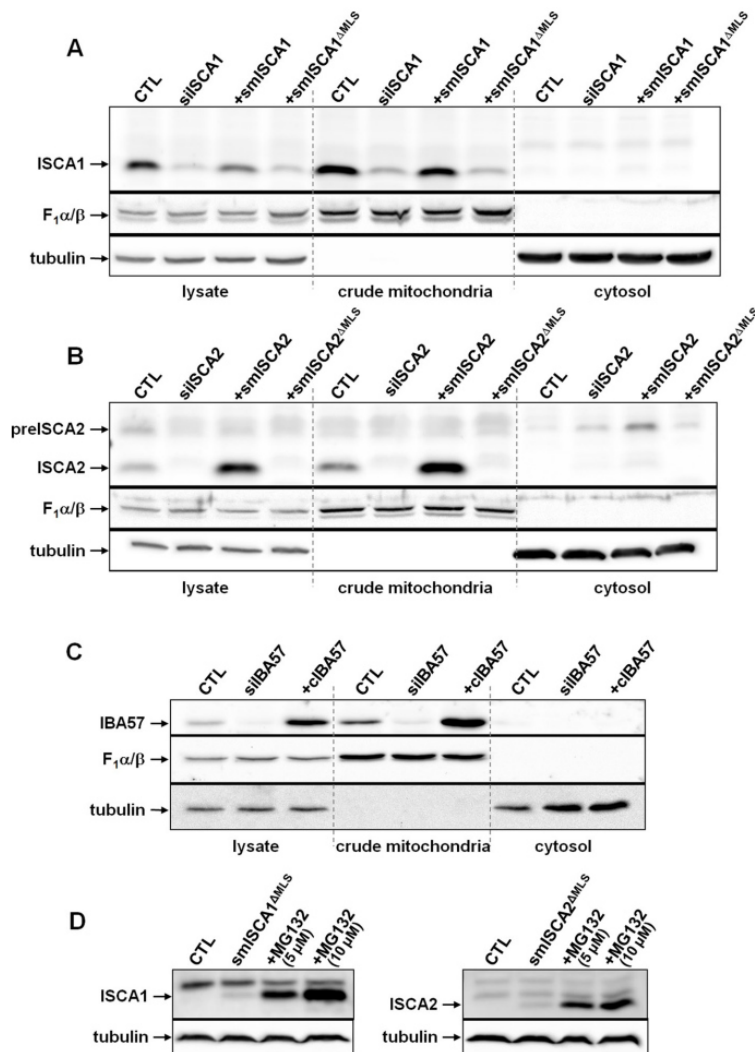


FIGURE 3: Complementing proteins smISCA1, smISCA2 and cIBA57 functionally localize to mitochondria. HeLa cells were transfected three times as in Figure 2 with specific siRNAs as indicated. Cells were harvested 3 d after the third transfection and fractionated by digitonin treatment as in Figure 1. Cell extracts were analyzed by immunoblotting for the indicated proteins using F₁α/β ATP synthase and tubulin as loading controls. Additional samples were cotransfected with the indicated siRNAs plus a vector encoding the corresponding ISC proteins for complementation testing (+smISCA1, +smISCA2, and +cIBA57). In the cases of ISCA1 (A) and ISCA2 (B) these vectors were resistant to RNAi due to silent mutations (sm). Cells were also cotransfected with smISCA1 or smISCA2 vectors lacking the coding information for the mitochondrial localization sequences (ΔMLS). In the case of IBA57 (C) no mutagenesis was necessary to create complementing IBA57 (cIBA57) since the used siRNA bound at the 3' untranslated region. (D) HeLa cells were transfected with vectors smISCA1ΔMLS and smISCA2ΔMLS, respectively, and 48 h after transfection, a subset of cells was grown in the presence of 5 or 10 μM of the proteasome inhibitor MG132 for 16 h. Harvested cells were lysed, and cell extracts were subjected to immunostaining. preISCA2, putative precursor form of ISCA2.

ferrochelatase (FC; see later discussion) all tested mitochondrial Fe/S proteins (mitochondrial aconitase [mAco], SDH, several proteins of complex I, and Rieske Fe/S protein) were decreased substan-

tially under deficiency of ISCA1 or ISCA2.

To further investigate the effects of ISCA or IBA57 depletion, we measured the enzyme activities of several other Fe/S proteins and

The levels of control proteins lacking an Fe/S cluster, such as the α and β subunits of F₁-ATP synthase, were not altered significantly (Figures 2 and 3). The substantial decrease of cytochrome c oxidase-2 (COX-2) of COX lacking Fe/S clusters cannot easily be explained, but a COX defect is also seen in Isa-depleted yeast cells (Mühlenhoff et al., 2011). This effect may well be a pleiotropic consequence of the specific loss of respiratory complexes I and II. The protein mAco, which was not as strongly diminished after ISCA depletion as other Fe/S proteins, was not affected by transfection with siRNA against IBA57. This may be attributed to the relatively inefficient depletion of IBA57 (Figure 2C). It is worthy to note that depletion of ISCA2 was stronger than that of ISCA1, which is congruent with the lower levels of mAco observed in ISCA2 siRNA-treated cells. The rescue constructs completely or at least partially restored the amounts of all proteins seen to decrease under depletion conditions, validating the specificity of the RNAi treatment and showing a functional complementation by the respective plasmid-encoded ISC proteins.

In addition to the measurement of Fe/S protein levels, the activity of the mitochondrial enzyme lipoic acid synthase can directly be followed by analyzing the levels of protein-bound lipoic acid by immunoblotting with an antibody that specifically recognizes this cofactor (Onder et al., 2006; Gelling et al., 2008). Human cells possess four lipoic acid-dependent enzymes, which are all localized in mitochondria: the E2 components of pyruvate dehydrogenase complex (DLAT; ~70 kDa), 2-oxo-glutarate dehydrogenase complex (DLST; ~42 kDa), and branched-chain α-ketoacid dehydrogenase complex (DBT; ~46 kDa), as well as the H protein of the glycine cleavage system (GCSH; ~14 kDa). In HeLa cells the anti-lipoic acid antibodies recognized two distinct bands that corresponded in electrophoretic mobility to PDH-E2 and KDH-E2 (Figure 5A). Depletion of ISCA1, ISCA2, or IBA57 resulted in strongly decreased detection of these bands, indicating a lower content in lipoic acid. Again, expression of the respective ISC proteins from the rescue plasmids restored the amount of lipoic acid-modified enzymes to normal. Together these results show that ISCA- and IBA57-depleted cells contain lower levels of mitochondrial Fe/S proteins, suggesting that these cells show a defect in the biogenesis

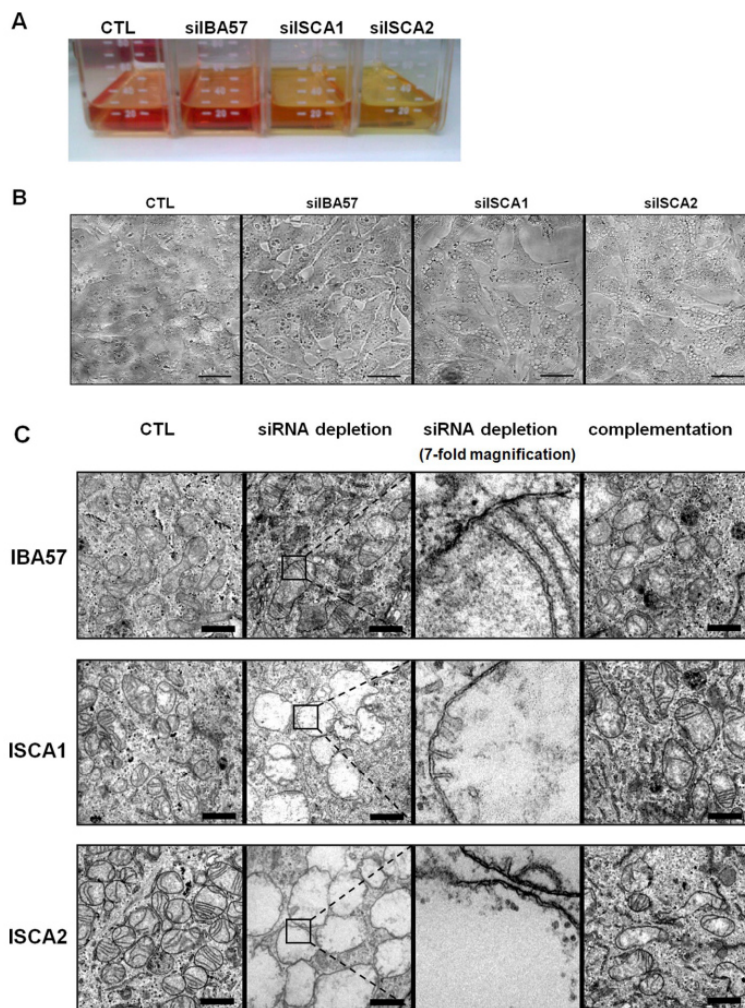


FIGURE 4: A decrease in ISCA1, ISCA2, or IBA57 causes severe physiological and morphological changes. HeLa cells were transfected as depicted in Figure 3. (A) Culture media of cells thrice transfected with silISCA1, silISCA2, or silIBA57 or mock-treated control cells (CTL) are shown. The color change of the pH indicator (phenol red) from red toward yellow indicates a drop in pH of the media. (B) After the third transfection HeLa cells were seeded on coverslips and grown for 3 d. Cell morphology was then examined by light microscopy. Scale bars, 30 μ m. (C) Three days after the final transfection, cells were fixed in culture dishes and evaluated by transmission electron microscopy. To better visualize the presence of the mitochondrial double membranes, the boxed areas in the respective siRNA-depleted samples are shown at sevenfold higher magnification in the third panel. Scale bars, 1 μ m.

non-Fe/S control proteins. Both ISCA1 and ISCA2 depletion significantly diminished the activities of mAco and SDH (Figure 5B). The activity of mitochondrial citrate synthase did not change appreciably and was used to normalize the data for mAco and SDH. It is somewhat surprising that there was also a marked decrease in COX activity, even though this enzyme does not contain any Fe/S cluster. All these activities were restored upon cotransfection with complementing psmlSCA plasmids (comp), but no effect was obtained with the cytosol-targeted versions (Δ MLS). Consistent with the immunoblot-

ting data, IBA57 deficiency did not affect mAco activity but significantly decreased SDH activity. We further estimated the enzymatic function of complex I (NADH-CoQ dehydrogenase) using in-gel activity measurements. Complex I activity was severely affected by ISCA1 or ISCA2 deficiency (Figure 5C). IBA57 depletion also decreased complex I activity but to a lesser degree. Taken together, these data clearly document a specific defect in mitochondrial Fe/S proteins after depletion of the ISCA and IBA57 proteins.

In contrast to all other Fe/S enzymes analyzed here previously, we detected no change in FC protein levels under limiting ISCA or IBA57 concentrations (Figure 5A). We therefore directly measured the FC catalytic activity by incubating cell pellets with deuteroporphyrin and ^{55}Fe in the presence of ascorbate followed by organic extraction of heme (Lange *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2009). FC activity was not compromised when the ISCA or IBA57 proteins were depleted (Figure 5D). As a control, depletion of Fdx2, which was previously shown to elicit a decrease in FC protein amount (Sheftel *et al.*, 2010b), reduced FC activity to ~30% of mock-transfected cells. Consistent with these in vitro data, total heme levels of HeLa cells did not change in ISCA- and IBA57-depleted cells (Figure 5E). On treatment with succinylacetone, an inhibitor of heme biosynthesis, a fourfold lower heme content was found. These data unambiguously show that the ISCA and IBA57 proteins are not required for FC function in heme synthesis, suggesting normal maturation of its [2Fe-2S] cluster. In contrast, the ISC component Fdx2, which functions in early stages of Fe/S protein biogenesis and thus is required for maturation of all cellular Fe/S proteins, is also essential for maturation of this [2Fe-2S] protein. Our data are therefore compatible with the idea that the ISCA and IBA57 proteins act later in the ISC assembly pathway and may specifically function in [4Fe-4S] protein maturation.

A role of the ISCA and IBA57 proteins for Fe/S protein maturation in the cytosol?

Previous studies identified (overproduced) ISCA1 in the cytosol and consequently assigned a role to the protein in the maturation of cytosolic IRP1 and xanthine oxidase Fe/S proteins (Song *et al.*, 2009). Because we did not detect ISCA and IBA57 proteins in this compartment under physiological conditions (see earlier discussion), we examined the effect of depletion of these proteins on the maturation of cytosolic Fe/S proteins. The protein levels of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD; Schnackerz *et al.*, 2004) and glutamate phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase (GPAT; Martelli *et al.*, 2007; Sheftel *et al.*, 2010b) are indicative of the amounts of Fe/S clusters

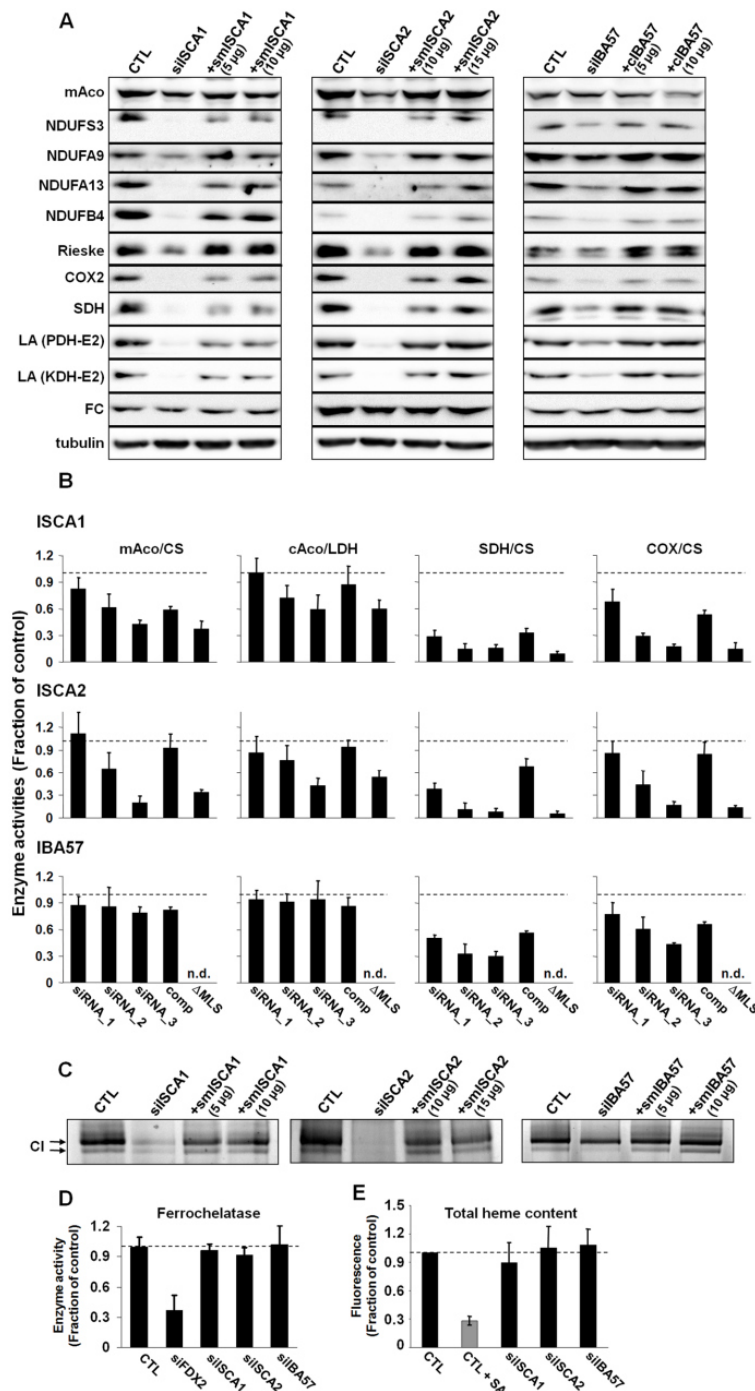


FIGURE 5: Depletion of ISCA1, ISCA2, or IBA57 affects maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins and cytosolic aconitase. HeLa cells were treated as described in Figure 3 with siRNAs and the indicated amounts of complementing plasmids. (A) Cell lysates of the third transfection (grown for 9 d) were examined by immunostaining with the indicated antibodies. Staining against tubulin served as a loading control. COX-2, cytochrome oxidase 2; CTL, mock-treated cells; FC,

associated with these proteins. DPYD and GPAT levels were not significantly altered by any of the RNAi treatments for ISCA and IBA57 protein depletion, in contrast to the severe effect upon depletion of NBP35 or ISCU (Figure 6A and Supplemental Figure 2). Similarly, no significant decrease of cytosolic IRP1 protein levels was observed. A clear (twofold to threefold) decrease in cytosolic aconitase activity (cAco; normalized to lactate dehydrogenase) was detected when cells were treated with siRNA against ISCA1 or ISCA2 but not IBA57 (Figure 5B). To examine whether this diminished activity could

ferrochelatase; KDH, α -ketoglutarate dehydrogenase; LA, lipoic acid; mAco, mitochondrial aconitase; NDUFA9, subunit A9 of complex I; NDUFA13, subunit A13 of complex I; NDUFB4, subunit B4 of complex I; NDUFS3, subunit S3 of complex I; PDH, pyruvate dehydrogenase; Rieske, Fe/S protein of complex III; SDH, succinate dehydrogenase. (B) Harvested cells were fractionated by digitonin treatment and centrifugation (Figure 1A). Fractions were analyzed for the indicated enzyme activities by spectrophotometry. Citrate synthase (CS) and lactate dehydrogenase (LDH) activities were used to normalize mitochondrial and cytosolic enzyme quantifications, respectively. For each transfection set, values of treated cells were normalized to those of mock-treated control cells. The average (SD) of three sets of normalized values is presented. Suffix 1 to 3, number of transfections; comp, complementation construct after third transfection; Δ MLS, respective complementation construct lacking the mitochondrial localization sequence, after third transfection; n.d., not determined. (C) Cell pellets from B (third transfection) were mechanically lysed and subjected to blue native-PAGE. Complex I activity was determined using an in-gel activity assay. (D) After the third transfection, ferrochelatase enzyme activity was estimated by following the incorporation of ^{55}Fe into deuteroporphyrin IX. The resultant ^{55}Fe -heme formation was normalized to that of mock-treated control cells (CTL), and three data sets were averaged. The analysis includes cells RNAi depleted for human ferredoxin 2 (siFDX2; Sheftel et al., 2010b). (E) To measure the total heme content after three rounds of transfection, cell pellets were dissolved in 2 M oxalic acid and boiled for 30 min, which releases iron from heme, thus generating fluorescent protoporphyrin IX (Morrison, 1965; Ward et al., 1984). As a control, HeLa cells were treated with 0.1 mM of the heme biosynthesis inhibitor succinyl acetone (SA) and harvested after 3 d. Fluorescence emission was determined and normalized to that of control cells. Three independent data sets were averaged. Error bars represent SDs.

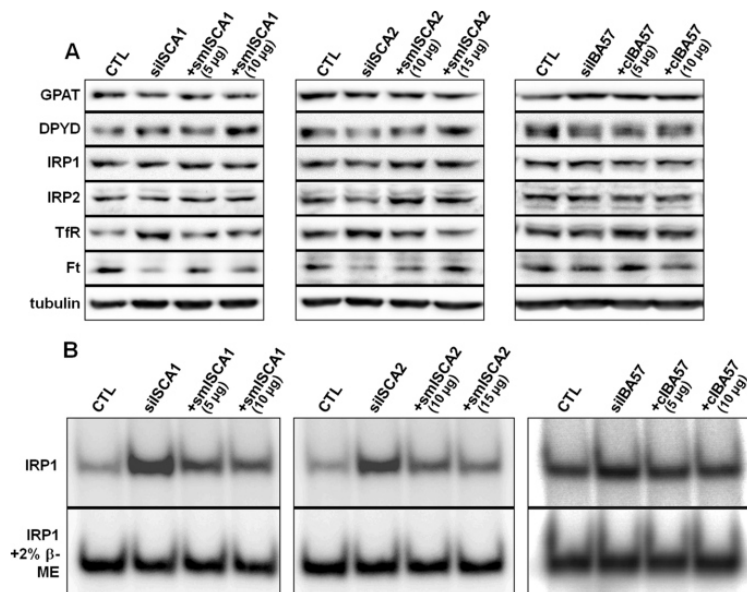


FIGURE 6: Depletion of ISCA1, ISCA2, or IBA57 affects IRP1 but not other cytosolic Fe/S proteins. HeLa cells were transfected as in Figure 5A. (A) Cell lysates of the third transfection were examined by immunoblotting using the indicated antibodies. Tubulin served as a loading control. (B) Cell lysates from A were analyzed for IRP1-binding activity to the iron-responsive element of ferritin mRNA by electrophoretic mobility shift assay. Because IRP1 and IRP2 possess the same running behavior, anti-IRP2 antibodies were used to supershift the corresponding protein. Treatment with 2% β -mercaptoethanol (β -ME) was used to reveal the maximal IRP1-binding capacity.

be rescued by overexpressing ISCA1 or ISCA2 in the cytosol, we cotransfected the cells with the corresponding Δ MLS rescue plasmids lacking the coding information for their mitochondrial presequence. The cytosolic versions of these ISC assembly proteins were unable to restore cAco activity, whereas the full-length ISCA proteins almost fully reverted the cAco activity back to control levels.

When cAco loses its Fe/S cluster, the protein assumes a conformation that confers a high affinity for mRNA stem-loop structures known as iron-responsive elements (IREs; Rouault, 2006; Wallander et al., 2006). Referred to as "IRP1 activity," the amount of IRP1-bound IRE in this state can be estimated by conducting electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) using radiolabeled IRE-containing mRNA as a probe. As depicted in Figure 6B, ISCA1, ISCA2, or IBA57 depletion resulted in an increase in IRP1-IRE binding activity that was complemented by overexpression of the respective RNAi-resistant ISC genes from the rescue constructs. Treatment of the lysates with 2% β -mercaptoethanol allowed visualization of the total amount of IRP1 present. Consistent with the immunoblots, no changes in total IRP1 protein levels were observed. Thus the EMSA measurements fully corroborated the observations made for the enzyme activities of IRP1. Taken together, the analyses of three different cytosolic Fe/S proteins demonstrate differential effects of the ISCA and IBA57 protein deficiencies. On the one hand, the normal levels of DPYD and GPAT suggest no general function of these mitochondrial ISC proteins in cytosolic Fe/S protein maturation. On the other hand, there is a clear decrease in mature cAco upon their depletion.

Effect of ISCA and IBA57 protein depletion on key proteins of iron homeostasis

The activation of the IRE-binding activity of IRP1 upon ISCA and IBA57 protein depletion suggested consequences on proteins of cellular iron metabolism. Transferrin receptor (TfR), the gateway for iron import into most cells, harbors IRE stem loops in its mRNA's 3' untranslated region (UTR), endowing its mRNA greater stability upon IRP binding. On the contrary, an IRE present in the 5'UTR of ferritin (Ft) mRNA blocks translation of the protein under elevated IRP activity, allowing reciprocal regulation of Ft, which fits to Ft's function as an iron-storage protein. As expected, ISCA protein-deficient cells, with their greater IRP1 activity, have increased TfR and decreased Ft levels (Figure 6A). Likely due to the limited depletion efficiency, IBA57-deficient cells showed only weak effects on TfR and Ft levels. We therefore conclude that ISCA and IBA57 depletion results in detectable effects on cAco/IRP1 maturation, which, in turn, leads to a dysregulation of two key proteins of cellular iron metabolism. Finally, we analyzed the levels of IRP2 upon ISCA or IBA57 depletion. The amount of IRP2 slightly decreased, yet only under ISCA2 deficiency (Figure 6A). This decrease is likely a consequence of the increased cellular iron uptake due to higher transferrin receptor

levels. Of note, this result was opposite to what is seen for depletion of ISC assembly proteins, which severely affects cytosolic Fe/S protein biogenesis (such as FDX2; see, e.g., Sheftel et al., 2010b).

DISCUSSION

Our study presents the identification and functional characterization of important members of the mitochondrial ISC assembly machinery termed ISCA1, ISCA2, and IBA57. We show that these proteins are localized and functional inside mitochondria and represent important components for mitochondrial biogenesis. Their depletion in cell culture caused striking alterations in mitochondrial morphology, including a vast enlargement of the organelles and a loss of cristae membranes. Such a phenotype has been previously observed in cases of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations (Nass, 1984; Chang et al., 2004; Gdynia et al., 2010). This eye-catching effect is explained by a molecular function of these proteins in the maturation of several mitochondrial Fe/S proteins carrying a [4Fe-4S] cluster, including complexes I and II of the respiratory chain. The functional defect of these complexes and of aconitase usually contributes to the loss of cristae membranes and of mtDNA (Stevens, 1981; Chen et al., 2005). We previously documented similar yet distinct morphological changes of cells depleted of the core ISC assembly machinery components Nfs1, ferredoxin 2, or the complex I-specific Fe/S maturation factor Ind1 (Biederbick et al., 2006; Sheftel et al., 2009, 2010b). The biogenesis of the [2Fe-2S] protein ferrochelatase, on the other hand, occurred independent of the ISCA and IBA57-depleted proteins, and the heme content was unchanged, excluding a role of

these proteins in heme synthesis. Hence we propose that the ISCA and IBA57 proteins play a dedicated role in the biogenesis of [4Fe-4S] clusters and/or their insertion into apoproteins and not in heme synthesis. Recent studies provide compelling evidence for an essential requirement of bacterial and yeast relatives of human ISCA1, ISCA2, and IBA57 for efficient maturation of [4Fe-4S] proteins (Tan *et al.*, 2009; Mühlenhoff *et al.*, 2011). We therefore conclude that the dedicated function of the *IscA* and *Iba57* proteins is conserved from bacteria to human. Nevertheless, there are characteristic differences between the various A-type ISC proteins in the different organisms, showing that the specificity of these proteins for their Fe/S protein targets may vary. For instance, *IscA2*/ISCA2, which can clearly be distinguished in its primary sequence from *IscA1*/ISCA1 and is unique for eukaryotes, cannot be replaced by bacterial A-type ISC proteins, in contrast to *IscA1*/ISCA1 (Mühlenhoff *et al.*, 2011). Bacterial *ErpA* is highly specific for the maturation of [4Fe-4S] proteins in isoprene biosynthesis, whereas *IscA* and *SufA* have a broader target spectrum (Loiseau *et al.*, 2007).

Little has been known about human ISCA1 and ISCA2 or their mutual partner protein IBA57 (Gelling *et al.*, 2008). Inspired by the results of a high-throughput screen, a recent study found a small proportion of cellular ISCA1 in a cytosolic fraction. From these results a role of ISCA1 in cytosolic Fe/S protein maturation was proposed (Song *et al.*, 2009), and yet a lysis of mitochondria during cell fractionation was not excluded. Similar to the results in our report, Song *et al.* (2009) observed a decrease in both mitochondrial and cytosolic aconitase activity in cells depleted of ISCA1. However, we were unable to rescue cytosolic aconitase activity in ISCA-deficient cells by overexpressing the respective ISCA proteins in the cytosol. Moreover, despite a strong depletion of ISCA1 (or ISCA2) in HeLa cells, our experiments failed to elicit appreciable decreases in the extramitochondrial [4Fe-4S] proteins GPAT and DPYD. Both proteins are highly sensitive tools for measuring Fe/S protein biogenesis, and their protein levels are strongly compromised under all instances of core mitochondrial or cytosolic Fe/S protein biogenesis deficiency (Stehling *et al.*, 2004, 2008; Martelli *et al.*, 2007; Sheftel *et al.*, 2010b). Furthermore, Song *et al.* (2009) demonstrate that the acute recovery rate of cAco activity, following peroxide treatment, is unaffected by ISCA1 depletion, suggesting that the cytosolic repair of reactive oxygen species (ROS)-damaged cAco does not require a cytosolic ISCA1 isoform. Finally and most convincing, we were able to detect overproduced ISCA1 or ISCA2 in the cytosol of HeLa cells, but only when proteasomal activity was compromised by the inhibitor MG132. These experiments show that the ISCA proteins became synthesized in the cytosol and yet were efficiently degraded in this compartment. We therefore reason that these proteins are not located outside mitochondria, and we propose that the effect on IRP1 activity upon ISCA protein depletion might be an indirect phenotype.

The conclusion that ISCA and IBA57 proteins are not directly involved in the maturation of extramitochondrial Fe/S proteins is supported by recent findings in yeast and trypanosomes (Long *et al.*, 2011; Mühlenhoff *et al.*, 2011). In yeast, growth conditions were observed that lead to defects in cytosolic Fe/S proteins (Kaut *et al.*, 2000; Pelzer *et al.*, 2000). How can these effects be explained? *IscA*/ISCA depletion elicits a potent inhibition of several complexes of the mitochondrial electron transport chain. Such a condition is expected to increase the levels of ROS in the cells (Herrero *et al.*, 2008), which are known to particularly destabilize labile Fe/S clusters, for instance, that of aconitase or yeast *Leu1* (Brazzolotto *et al.*, 1999; Pantopoulos, 2004; Mühlenhoff *et al.*, 2011). Consistent with this notion, depletion of human *Ind1*—an assembly factor specifically required for

the Fe/S protein maturation of complex I—also elicited a modest, likely indirect decrease in cytosolic aconitase activity (Sheftel *et al.*, 2009).

Depletion of ISCA and IBA57 proteins in HeLa cells affects the citric acid cycle in four different enzymes: the two Fe/S proteins aconitase and succinate dehydrogenase and the lipoic acid-dependent enzymes pyruvate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase. The functional defect of these enzymes was proposed to decrease the efficiency of the citric acid cycle and in turn to diminish the level of succinyl-CoA, a precursor of porphyrins and heme (Ye and Rouault, 2010a). It therefore was surprising that HeLa cells depleted in these three ISC proteins contain a normal amount of heme. What might be the explanation for this observation? As mentioned, heme synthesis catalyzed by the [2Fe-2S] protein ferrochelatase appears to be unaffected in these deficiencies. Moreover, it is evident that the net production of succinyl-CoA in the ISC protein-depleted situation must occur independent of a functional citric acid cycle and instead is maintained by other biosynthetic reactions. Several such pathways are known (Lehninger *et al.*, 2008). First, succinyl-CoA can be synthesized from the branched-chain amino acids isoleucine and valine. However, this requires the activity of branched-chain ketoacid dehydrogenase, another mitochondrial lipoic acid-dependent enzyme, which therefore should also be inefficient. A second possibility is the conversion of propionyl-CoA derived from either methionine or odd-numbered fatty acids to succinyl-CoA via methyl-malonyl-CoA. This sequence of reactions is independent of the citric acid cycle and hence may produce enough succinyl-CoA to satisfy the requirement for normal heme biosynthesis.

We observed a puzzling decrease in COX activity and protein (COX-2) under ISCA- and IBA57-depletion conditions in both human and yeast cells (Mühlenhoff *et al.*, 2011) despite the fact that COX does not contain Fe/S clusters. As discussed earlier, this effect is not caused by a compromised heme biosynthesis (see also Long *et al.*, 2011). Similarly, it is unlikely to be the result of an impaired heme A production, since this reaction depends on the [2Fe-2S] ferredoxin *Yah1*, which is unaffected in its maturation in *IscA*-*Iba57*-deficient yeast cells and possibly in respective human cells (Sheftel *et al.*, 2010b; Mühlenhoff *et al.*, 2011). A reasonable explanation for the cytochrome c oxidase deficiency may therefore be the overall failure of ISCA- and IBA57-deficient cells to assemble respiratory complexes I and II and their supercomplexes, consequently eliciting a pleiotropic effect on other members of the electron transfer chain. This interpretation may also explain the decrease of the [2Fe-2S]-carrying Rieske Fe/S protein of complex III. In *IscA*-depleted yeast cells the [2Fe-2S] cluster can still be inserted at wild-type efficiency in the matrix, excluding a direct function of the *IscA* proteins in [2Fe-2S] cluster insertion into this protein (Mühlenhoff *et al.*, 2011). This may be similar in human cells, and yet complex III assembly fails due to the defects in complexes I and II. In striking contrast to ISCA-IBA57 deficiency, RNAi depletion of *Ind1* caused a potent decrease in complex I activity and protein without affecting COX function (Sheftel *et al.*, 2009). Although this reemphasizes the specificity of *Ind1* for complex I assembly, we cannot exclude the possibility that other, yet-to-be-identified [4Fe-4S] proteins are involved in a more direct manner in COX maturation.

In summary, our study characterizes ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins as crucial components of the mitochondrial ISC assembly machinery. Our present work and a recent investigation in yeast (Mühlenhoff *et al.*, 2011) show that these proteins are specifically required for the generation of [4Fe-4S] clusters and their dedicated insertion into mitochondrial apoproteins. Potential diseases arising from mutations in these genes are expected to elicit defects in

mitochondrial respiration and in lipoic acid-dependent proteins (Cameron *et al.*, 2011; Navarro-Sastre *et al.*, 2011).

MATERIALS AND METHODS

Materials

siRNAs were purchased from Applied Biosystems (Foster City, CA; sequences are in Supplemental Table S1). For all assays performed, two separate scrambled siRNAs resulted in identical effects as mock transfections, which served as controls in all experiments. Polyclonal antibodies were raised in rabbits using purified proteins produced in *E. coli*. The remaining antibodies used were against F₁ α / β , Rieske, COX-2 (H. Schagger and J. Wittig), TfR (Zymed, San Francisco, CA), Ft (ICN Biomedical, Irvine, CA), tubulin (clone DM1 α ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), SDH, NDUFS3, NDUFA9, NDUFB4, and NDUFA13 (MitoSciences, Eugene, OR), lipoic acid (Calbiochem, La Jolla, CA), DPYD (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), IRP2 and IRP1 (R. Eisenstein), GPAT (H. Puccio), mAco (L. Szveda), and ferrochelatase (T. and H. A. Dailey). Cell culture reagents were purchased from PAA Laboratories (Pasching, Austria). All other reagents were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany) unless specified otherwise. HeLa cells were grown in DMEM containing 4.5 g/l glucose and supplemented with 8% fetal calf serum, 1 mM glutamine, and 1% penicillin-streptomycin.

Plasmids

All oligonucleotides used, including siRNA sequences, are provided in Supplemental Table S1. Human cDNA clones for ISCA1, ISCA2 (imaGenes, Source BioScience LifeScience, Nottingham, United Kingdom), and IBA57 (Invitrogen, Carlsbad, CA) were purchased. The IBA57 clone was missing the first three codons, which were added by PCR amplification during subcloning. For recombinant expression, PCR amplification was used to clone the genes without their predicted mitochondrial targeting sequences into pETDuet-1 (Novagen, EMD4Biosciences, Gibbstown, NJ), which incorporates a hexahistidine tag. C43 (DE3) *E. coli* already harboring a plasmid encoding the GroES-GroEL chaperone system (plasmid kindly supplied by M. Hayer-Hartl, Martinsried, Germany) were used for recombinant expression. The proteins were purified using a nickel-nitrilotriacetic acid column and, if necessary, contaminating chaperone proteins were removed by size-exclusion chromatography. For rescue experiments using ISCA1 and IBA57, both full-length cDNAs (plasmids pISCA1-GFP and pIBA57-GFP) and clones with the stop codon removed (pISCA1 and pIBA57) were cloned into pEGFP-N3 (Clontech, Mountain View, CA). Because the siRNA sequence used for IBA57 targeted the 3' untranslated region, no mutagenesis was required to generate a rescue construct (pIBA57). For ISCA1 (psmISCA1), mutagenesis was performed in those coding regions targeted by the siRNA to introduce silent changes in the gene sequence according to described methods (Zheng *et al.*, 2004). To generate the ISCA2 rescue mutant (psmISCA2; Supplemental Table S1), the gene was ordered from GenScript (Piscataway, NJ) and subcloned into pEGFP-N2. For all rescue constructs, versions without a stop codon before the EGFP tag were also generated (psmISCA1-GFP, psmISCA2-GFP, pIBA57-GFP). pDsRed2-Mito was from Clontech.

Miscellaneous procedures

Previously described methods were used for fractionating HeLa cells using digitonin, carrying out electroporation transfection, assaying the activities of mitochondrial and cytosolic aconitase, complex I, SDH, COX, citrate synthase, and LDH, and determining IRP-binding

activity (Stehling *et al.*, 2009). Immunoblots to detect ISCA1 and ISCA2 were generated from tricine-SDS-PAGE gels (Schagger, 2006). All bar graphs represent the average of at least three independent sets of transfections.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank R. Rösser for expert technical support, S. Molik for antibody generation, and an anonymous reviewer for suggesting the use of MG132. This work was generously supported by funds from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 593 and TR1, Gottfried-Wilhelm Leibniz Program, and GRK 1216), the von Behring-Röntgen Stiftung, the Max-Planck Gesellschaft, the Fonds der Chemischen Industrie (R.L.), the Alexander-von-Humboldt Stiftung, the Fonds de Recherche en Santé du Québec, and the Canadian Institutes of Health Research (A.D.S.).

REFERENCES

- Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, Schueck ND, Dean M, Koeller DM (1999). Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum Mol Genet* 8, 743–749.
- Biederick A, Stehling O, Rösser R, Niggemeyer B, Nakai Y, Elsässer HP, Lill R (2006). Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation. *Mol Cell Biol* 26, 5675–5687.
- Brazzolotto X, Gaillard J, Pantopoulos K, Hentze MW, Moulis JM (1999). Human cytoplasmic aconitase (iron regulatory protein 1) is converted into its [3Fe-4S] form by hydrogen peroxide in vitro but is not activated for iron-responsive element binding. *J Biol Chem* 274, 21625–21630.
- Camaschella C, Campanella A, De Falco L, Boschetto L, Merlini R, Silvestri L, Levi S, Iolascon A (2007). The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* 110, 1353–1358.
- Cameron JM, Janer A, Levandovskiy V, Mackay N, Rouault TA, Tong WH, Ogilvie I, Shoubridge EA, Robinson BH (2011). Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. *Am J Hum Genet* 89, 486–495.
- Chang TM, Chi CS, Tsai CR, Lee HF, Li MC (2004). Paralytic ileus in MELAS with phenotypic features of MNGIE. *Pediatr Neurol* 31, 374–377.
- Chen XJ, Wang X, Kaufman BA, Butow RA (2005). Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science* 307, 714–717.
- Ding B, Smith ES, Ding H (2005). Mobilization of the iron centre in IscA for the iron-sulphur cluster assembly in IscU. *Biochem J* 389, 797–802.
- Ding H, Clark RJ (2004). Characterization of iron binding in IscA, an ancient iron-sulphur cluster assembly protein. *Biochem J* 379, 433–440.
- Gdynia G *et al.* (2010). Danger signaling protein HMGB1 induces a distinct form of cell death accompanied by formation of giant mitochondria. *Cancer Res* 70, 8558–8568.
- Gelling C, Dawes IW, Richhardt N, Lill R, Mühlenhoff U (2008). Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Mol Cell Biol* 28, 1851–1861.
- Gupta V, Sendra M, Naik SG, Chahal HK, Huynh BH, Outten FW, Fontecave M, Ollagnier de CS (2009). Native *Escherichia coli* SufA, coexpressed with SufBCDSE, purifies as a [2Fe-2S] protein and acts as an Fe-S transporter to Fe-S target enzymes. *J Am Chem Soc* 131, 6149–6153.
- Herrero E, Ros J, Belli G, Cabisco E (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 1780, 1217–1235.
- Huber C, Eisenreich W, Hecht S, Wachtershauser G (2003). A possible primordial peptide cycle. *Science* 301, 938–940.
- Jensen LT, Culotta VC (2000). Role of *Saccharomyces cerevisiae* ISA1 and ISA2 in iron homeostasis. *Mol Cell Biol* 20, 3918–3927.
- Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK (2005). Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem* 74, 247–281.
- Jones ML (2008). Lipids. In: *Theory and Practice of Histological Techniques*, ed. JD Bancroft, M Gamble, Philadelphia: Churchill Livingstone, 187–215.
- Kaut A, Lange H, Diekert K, Kispal G, Lill R (2000). Isa1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur

- proteins and requires conserved cysteine residues for function. *J Biol Chem* 275, 15955–15961.
- Knight SA, Sepuri NB, Pain D, Dancis A (1998). Mt-Hsp70 homolog, Ssc2p, required for maturation of yeast frataxin and mitochondrial iron homeostasis. *J Biol Chem* 273, 18389–18393.
- Krebs C, Agar JN, Smith AD, Frazzon J, Dean DR, Huynh BH, Johnson MK (2001). IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis. *Biochemistry* 40, 14069–14080.
- Lange H, Kispal G, Lill R (1999). Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria. *J Biol Chem* 274, 18989–18996.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (2008). *Principles of Biochemistry*, San Francisco: WH Freeman.
- Lison L, Dagnelie J (1935). *Methodes nouvelles de coloration de la myéline*. *Bull Histol Appl Physiol Pathol Technique Microsc* 12, 85–91.
- Loiseau L, Gerez C, Bekker M, Ollagnier-de CS, Py B, Sanakis Y, Teixeira de MJ, Fontecave M, Barras F (2007). ErpA, an iron sulfur (Fe S) protein of the A-type essential for respiratory metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 13626–13631.
- Long S, Changmai P, Tsaousis AD, Skaliky T, Verner Z, Wen YZ, Roger AJ, Lukes J (2011). Stage-specific requirement for Isa1 and Isa2 proteins in the mitochondrion of *Trypanosoma brucei* and heterologous rescue by human and *Blastocystis* orthologues. *Mol Microbiol* 81, 1403–1418.
- Lu J, Bitoun JP, Tan G, Wang W, Min W, Ding H (2010). Iron-binding activity of human iron-sulfur cluster assembly protein hIsaA1. *Biochem J* 428, 125–131.
- Martelli A, Wattenhofer-Donze M, Schmucker S, Bouvet S, Reutenauer L, Puccio H (2007). Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues. *Hum Mol Genet* 16, 2651–2658.
- Morrison GR (1965). Fluorometric microdetermination of heme protein. *Anal Chem* 37, 1124–1126.
- Mühlenhoff U, Gerl MJ, Flaugar B, Pirner HM, Balser S, Richhardt N, Lill R, Stolz J (2007). The ISC proteins Isa1 and Isa2 are required for the function but not for the de novo synthesis of the Fe/S clusters of biotin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 6, 495–504.
- Mühlenhoff U, Richter N, Pines O, Pierik AJ, Lill R (2011). Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *J Biol Chem* 286, 41205–41216.
- Nass MM (1984). Analysis of methylglyoxal bis(guanyldrydrazone)-induced alterations of hamster tumor mitochondria by correlated studies of selective rhodamine binding, ultrastructural damage, DNA replication, and reversibility. *Cancer Res* 44, 2677–2688.
- Navarro-Sastre A et al. (2011). A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. *Am J Hum Genet* 89, 656–667.
- Nilsson R et al. (2009). Discovery of genes essential for heme biosynthesis through large-scale gene expression analysis. *Cell Metab* 10, 119–130.
- Ollagnier-de-Choudens S, Mattioli T, Takahashi Y, Fontecave M (2001). Iron-sulfur cluster assembly: characterization of IscA and evidence for a specific and functional complex with ferredoxin. *J Biol Chem* 276, 22604–22607.
- Onder O, Yoon H, Naumann B, Hippler M, Dancis A, Daldal F (2006). Modifications of the lipamide-containing mitochondrial subproteome in a yeast mutant defective in cysteine desulfurase. *Mol Cell Proteomics* 5, 1426–1436.
- Pantopoulos K (2004). Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann NY Acad Sci* 1012, 1–13.
- Pelzer W, Mühlenhoff U, Diekert K, Siegmund K, Kispal G, Lill R (2000). Mitochondrial Isa2p plays a crucial role in the maturation of cellular iron-sulfur proteins. *FEBS Lett* 476, 134–139.
- Rodriguez-Manzanique MT, Tamarit J, Belli G, Ros J, Herrero E (2002). Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell* 13, 1109–1121.
- Rouault TA (2006). The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol* 2, 406–414.
- Rouault TA, Tong WH (2008). Iron-sulfur cluster biogenesis and human disease. *Trends Genet* 24, 398–407.
- Schägger H (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1, 16–22.
- Schnackerz KD, Dobritzsch D, Lindqvist Y, Cook PF (2004). Dihydropyrimidine dehydrogenase: a flavoprotein with four iron-sulfur clusters. *Biochim Biophys Acta* 1701, 61–74.
- Sheftel A, Stehling O, Lill R (2010a). Iron-sulfur proteins in health and disease. *Trends Endocrinol Metab* 21, 302–314.
- Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Elsässer HP, Mühlenhoff U, Webert H, Hobler A, Hannemann F, Bernhardt R, Lill R (2010b). Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 11775–11780.
- Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Netz DJ, Kerscher S, Elsässer HP, Wittig I, Balk J, Brandt U, Lill R (2009). Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. *Mol Cell Biol* 29, 6059–6073.
- Song D, Tu Z, Lee FS (2009). Human ISCA1 interacts with IOP1/NARFL and functions in both cytosolic and mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem* 284, 35297–35307.
- Stehling O, Elsässer HP, Brückel B, Mühlenhoff U, Lill R (2004). Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. *Hum Mol Genet* 13, 3007–3015.
- Stehling O, Netz DJ, Niggemeyer B, Rösser R, Eisenstein RS, Puccio H, Pierik AJ, Lill R (2008). Human Nbp35 is essential for both cytosolic iron-sulfur protein assembly and iron homeostasis. *Mol Cell Biol* 28, 5517–5528.
- Stehling O, Sheftel AD, Lill R (2009). Controlled expression of iron-sulfur cluster assembly components for respiratory chain complexes in mammalian cells. *Methods Enzymol* 456, 209–231.
- Stevens B (1981). Mitochondrial structure. In: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, ed. JN Strathern, EW Jones, JR Broach, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 471–488.
- Tan G, Lu J, Bitoun JP, Huang H, Ding H (2009). IscA/SufA paralogues are required for the [4Fe-4S] cluster assembly in enzymes of multiple physiological pathways in *Escherichia coli* under aerobic growth conditions. *Biochem J* 420, 463–472.
- Tong WH, Rouault TA (2006). Functions of mitochondrial ISCU and cytosolic ISCU in mammalian iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. *Cell Metab* 3, 199–210.
- Uhrigshardt H, Singh A, Kovtunovich G, Ghosh M, Rouault TA (2010). Characterization of the human HSC20, an unusual DnaJ type III protein, involved in iron-sulfur cluster biogenesis. *Hum Mol Genet* 19, 3816–3834.
- Wallander ML, Leibold EA, Eisenstein RS (2006). Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* 1763, 668–689.
- Waller JC et al. (2010). A role for tetrahydrofolates in the metabolism of iron-sulfur clusters in all domains of life. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 10412–10417.
- Wang W, Huang H, Tan G, Si F, Liu M, Landry AP, Lu J, Ding H (2010). In vivo evidence for the iron-binding activity of an iron-sulfur cluster assembly protein IscA in *Escherichia coli*. *Biochem J* 432, 429–436.
- Ward JH, Jordan I, Kushner JP, Kaplan J (1984). Heme regulation of HeLa cell transferrin receptor number. *J Biol Chem* 259, 13235–13240.
- Wingert RA et al. (2005). Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* 436, 1035–1039.
- Ye H, Jeong SY, Ghosh MC, Kovtunovich G, Silvestri L, Ortillo D, Uchida N, Tisdale J, Camaschella C, Rouault TA (2010). Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts. *J Clin Invest* 120, 1749–1761.
- Ye H, Rouault TA (2010a). Erythropoiesis and iron sulfur cluster biogenesis. *Adv Hematol* 2010, pii: 329394 [Epub ahead of print].
- Ye H, Rouault TA (2010b). Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry* 49, 4945–4956.
- Zheng L, Baumann U, Reymond JL (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res* 32, e115.

Supplementary information for

**THE HUMAN MITOCHONDRIAL ISCA1, ISCA2, AND IBA57 PROTEINS ARE
REQUIRED FOR [4FE-4S] PROTEIN MATURATION**

**Alex D. Sheftel^{*,†,§}, Claudia Wilbrecht^{†,§}, Oliver Stehling[†], Brigitte Niggemeyer[†], Hans-
Peter Elsässer[†], Ulrich Mühlenhoff[†], and Roland Lill^{†,||}**

^{*}University of Ottawa Heart Institute, 40 Ruskin St., Ottawa, ON K1Y 4W7, Canada;

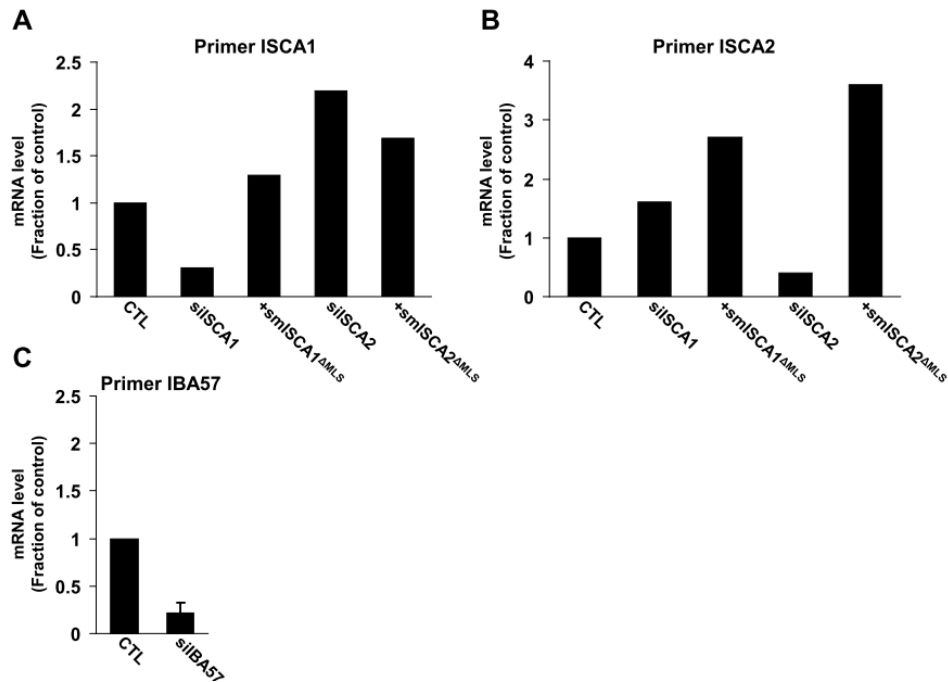
[†]Institut für Zytobiologie, Philipps-Universität-Marburg, Robert-Koch-Str. 6, 35037 Marburg,
Germany

[§]These authors contributed equally to the work.

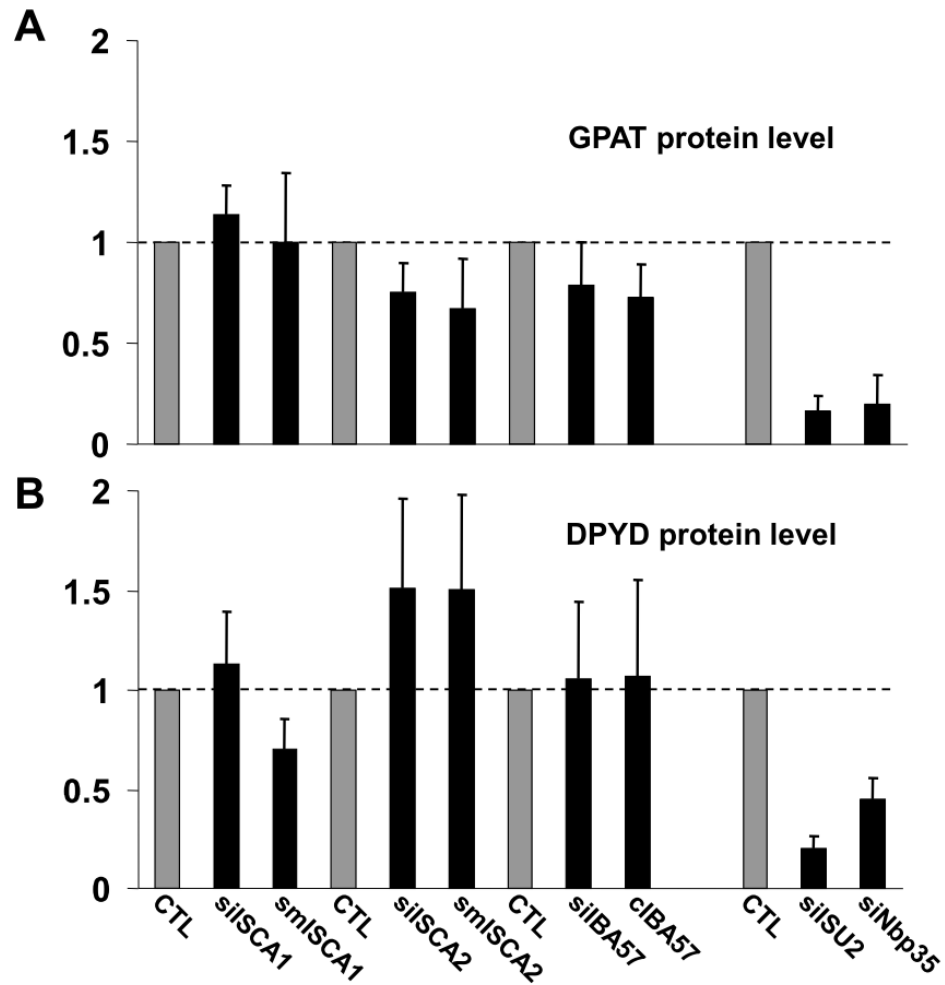
^{||}Corresponding author. Tel: +49-6421-286 6449; Fax: +49-6421-286 6414;

E-mail: lill@staff.uni-marburg.de

Supplementary Figures



Supplementary Figure S1. Determination of the mRNA levels of ISCA1, ISCA2 and IBA57. (A) and (B) ISCA1 and ISCA2 mRNAs lacking the mitochondrial localization sequence are successfully synthesized. HeLa cells were repeatedly transfected with either siISCA1 or siISCA2, or in conjunction with the respective complementing ISCA1 or ISCA2 vectors lacking the mitochondrial localization sequence (smISCA1 Δ MLS or smISCA2 Δ MLS; cf. Figure 3). After the final harvest total RNA was isolated, and cDNA was prepared in order to perform qRT-PCR with (A) ISCA1- or (B) ISCA2-specific primers. (C) HeLa cells transfected with siIBA57 were treated as in (A) and (B) in order to perform qRT-PCR with IBA57-specific primers. For IBA57 experiments, three independent datasets were averaged. Error bars represent standard deviations. In all instances, mRNA levels of siRNA-treated cells are normalized to values of mock-treated control cells (CTL).



Supplementary Figure S2. Quantification of GPAT and DPYD levels after depletion of ISCA and IBA57 proteins. HeLa cell extracts as those described in Figure 6A were analyzed by immunoblotting for the cytosolic Fe/S proteins GPAT (A) and DPYD (B). Quantification of the data was achieved using program TINA 20 (Raytest). As a control the levels of GPAT (Stehling *et al.*, 2008) and DPYD after RNAi-mediated depletion of ISCU and Nbp35 are shown ($n \geq 3$).

Supplementary Table S1. Oligonucleotides used in this study

Oligo#	Sequence(s)	Description
1	5' -CCAGAUCGGUGACUCCUA-3'	ISCA1 siRNA #1
2	5' -GGGCACCUGUUUAUCCAUU-3'	ISCA1 siRNA #2
3	5' -CAUAACCCAAACAUCAA-3'	ISCA1 siRNA #3
4	5' -CGACGACAGGGUUAUUGAA-3'	ISCA2 siRNA #1
5	5' -GGAUCCAAUACAAUUUU-3'	ISCA2 siRNA #2
6	5' -GAUCUCCGGAUUCCAAU-3'	ISCA2 siRNA #3
7	5' -AGCUCUAUGUUUCAGGGCA-3'	IBA57 siRNA
8	Fwd: 5' -ATGGTAGGATCCAGCAGCCCTCACCCCTGACACC-3' Rev: 5' -ATGGTACTGCAGTCAAATATTAAAGCTTCTCC-3'	Generate ISCA1 lacking mitochondrial localization sequence and add BamHI and PstI restriction sites for cloning into pETDuet-1.
9	Fwd: 5' -ATGGTAAGATCTACCATGGCGGCTTCCTTAGTC-3' Rev: 5' -ATGGTAGTCGACAATATTAAAGCTTCTCCAC-3'	Add Kozak sequence, remove stop codon, and add BglII and SalI restriction sites for cloning ISCA1 into pEGFP-N3 ("pISCA1-GFP").
10	Fwd: 5' -ATGGTAAGATCTACCATGGCGGCTTCCTTAGTC-3' Rev: 5' -GGTAGTCGACTCAAATATTAAAGCTTCTCCAC-3'	Add Kozak sequence and add BglII and SalI restriction sites for cloning ISCA1 into pEGFP-N3 ("pISCA1").
11	Fwd: 5' -TGTTTAAcAAtCctAAAtTAaGGGACTTGTGGCTGTGGAGAAAGC-3' Rev: 5' -TCCCcTTaATaTTaGGaTTgTTaAACACAACTCACTGGATAATTG-3'	Generate silent mutations in the coding region targeted by the siRNA pool in pISCA1 or pISCA-EGFP for evasion of RNAi ("psmiISCA1" and "psmiISCA1-EGFP"). Mutations in lowercase.
12	Fwd: 5' -GTAAGATCTACCATGGCAGCCCTCACCCCTGACA-3' Rev: 5' -ATGGTAGTCGACAATATTAAAGCTTCTCCAC-3'	Generate ISCA1 lacking mitochondrial localization sequence, remove stop codon, and add BglII and SalI restriction sites for cloning smISCA1 into pEGFP-N3 ("psmiISCA1 ^{ΔMLS} -GFP").
13	Fwd: 5' -GTAAGATCTACCATGGCAGCCCTCACCCCTGACA-3' Rev: 5' -GGTAGTCGACTCAAATATTAAAGCTTCTCCAC-3'	Generate ISCA1 lacking mitochondrial localization sequence and add BglII and SalI restriction sites for cloning smISCA1 into pEGFP-N3 without a GFP tag ("psmiISCA1 ^{ΔMLS} ").
14	Fwd: 5' -ATGGTAGGATCCAAATCCGCCTCAGACAGATTG-3' Rev: 5' -ATGGTACTGCAGTCAAAGTTTGATAGAGAAAGATG-3'	Generate ISCA2 lacking mitochondrial localization sequence and add BamHI and PstI restriction sites for cloning into pETDuet-1.
15	Fwd: 5' -ATGGTAAGATCTACCATGGCTGCCGCCTGGGGG-3' Rev: 5' -ATGGTAGTCGACAAGTTTGATAGAGAAAGATG-3'	Add Kozak sequence, remove stop codon, and add BglII and SalI restriction sites for cloning ISCA2 into pEGFP-N3 ("pISCA2-GFP").

4

		GFP").
16	Fwd: 5'-ATGGTAAGATCTACCATGGCTGCCGCCTGGGGG-3' Rev: 5'-ATGGTAGTCGACTCAAAGTTTGATAGAGAAAG-3'	Add Kozak sequence and add BglII and SalI restriction sites for cloning ISCA2 into pEGFP-N3 without a GFP tag ("pISCA2").
17	Fwd: 5'-TAAGATCTACCATGGTCCGCCTCAGACAGATT-3' Rev: 5'-ATGGTAGTCGACAAGTTTGATAGAGAAAGATG-3'	Generate ISCA2 lacking mitochondrial localization sequence, remove stop codon, and add BglII and SalI restriction sites for cloning smISCA2 into pEGFP-N3 ("psmiISCA2 ^{ΔMLS} -GFP").
18	Fwd: 5'-TAAGATCTACCATGGTCCGCCTCAGACAGATT-3' Rev: 5'-ATGGTAGTCGACTCAAAGTTTGATAGAGAAAGA-3'	Generate ISCA2 lacking mitochondrial localization sequence, remove stop codon, and add BglII and SalI restriction sites for cloning smISCA2 into pEGFP-N3 without a GFP tag ("psmiISCA2 ^{ΔMLS} ").
19	Fwd: 5'-ATGGTAGAATTCaCTGGCCACAGCTCCTGCAG-3' Rev: 5'-ATGGTAGTCGACCTACTTGGAGACTGTAGGCCA-3'	Generate IBA57 lacking mitochondrial localization sequence and add EcoRI and SalI restriction sites for cloning into pETDuet-1.
20	Fwd: 5'-ATGGTAAGATCTACCATGGCAGCCGCGGCGTCTTCGAGGCGC-3' Rev: 5'-ATGGTAGTCGACCTTGGAGACTGTAGGCCAC-3'	Add missing 3 codons, Kozak sequence, remove stop codon, and add BglII and SalI restriction sites for cloning IBA57 into pEGFP-N3 ("pIBA57-GFP").
21	Fwd: 5'-ATGGTAAGATCTACCATGGCAGCCGCGGCGTCTTCGAGGCGC-3' Rev: 5'-ATGGTAGTCGACCTACTTGGAGACTGTAGGCCA-3'	Add missing 3 codons, Kozak sequence, and add BglII and SalI restriction sites for cloning IBA57 into pEGFP-N3 ("pIBA57-GFP").
22	AGATCTATGGCTGCCGCCTGGGGTCTGTCCTAACGGCCGCGACGAGAG CGGTCACTCCCTGGCCGAGGGGACAGGCTCCTCAGGCCCTCCCTGGGACCCCA GGCGCGTCGGGAGGCGTCTCTCTCAGACCCCGAGGCGCGCAAGGCGAGATC CGCCTCAGACAGATTTGGCTCCAGAGGCTTTTGGAAATCACCAGAGGGTCA AATTCCTCAGGCTGCAAGTGGAGGAGGTGGATGCTCCGGATTCCAATACAA ATTTCACTGGATACAGTTATCAACCCGACGACAGGATTTGAACAGGGT GGGGCAAGAGTGGTGGTGAAGTCTGTAGCTTGGCCTTCGTGAAGGGGGCC AGGTGGAATTCAGCCCAAGAACTGATCCGAAGCTCATTTCAAGTGTGAACAA TCTCAAGCACAGCAAGGCTGCTCCTGTGGGTATCTTTCTCTATCAAATTT GGGTATACCACTGCAG	Sequence of smISCA2 construct that was purchased (GenScript). A 5' BglII and a 3' Bst1107I restriction site was added to the gene for cloning into pEGFP-N2 that was digested with BglII and either Eco136II or SmaI to generate "psmiISCA2-GFP" or "psmiISCA2", respectively.

5

6.2

Human Molecular Genetics, 2013, Vol. 22, No. 13 2590–2602
doi:10.1093/hmg/ddt107
Advance Access published on March 5, 2013

Mutation of the iron-sulfur cluster assembly gene *IBA57* causes severe myopathy and encephalopathy

Nikhita Ajit Bolar^{1,†}, Arnaud Vincent Vanlander^{2,†}, Claudia Wilbrecht^{3,†}, Nathalie Van der Aa¹, Joël Smet², Boel De Paepe², Geert Vandeweyer¹, Frank Kooy¹, François Eyskens⁴, Elien De Lattre², Gwenda Delanghe⁵, Paul Govaert⁵, Jules Gerard Leroy², Bart Loeys¹, Roland Lill^{3,6,7,*}, Lut Van Laer¹ and Rudy Van Coster^{2,*}

¹Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Antwerp University Hospital and University of Antwerp, Antwerp 2650, Belgium, ²Department of Pediatrics, Division of Pediatric Neurology and Metabolism, University Hospital Ghent, Ghent 9000, Belgium, ³Institut für Zytobiologie, Philipps-Universität Marburg, Robert-Koch Str. 6, Marburg 35032, Germany, ⁴Provinciaal Centrum voor de Opsporing van Metabole Aandoeningen (PCMA), Department of Pediatrics/Metabolic Diseases, Faculty of Medicine and Health Sciences, Antwerp University Hospital and University of Antwerp, Antwerp 2000, Belgium, ⁵Department of Neonatology, Paola Children's Hospital ZNA Middelheim, Antwerp 2000, Belgium, ⁶Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Karl-von-Frisch-Str. 10, Marburg 35043, Germany and ⁷LOEWE Zentrum für Synthetische Mikrobiologie SynMikro, Hans-Meerwein-Str., Marburg 35043, Germany

Received January 11, 2013; Revised and Accepted February 27, 2013

Two siblings from consanguineous parents died perinatally with a condition characterized by generalized hypotonia, respiratory insufficiency, arthrogryposis, microcephaly, congenital brain malformations and hyperglycinemia. Catalytic activities of the mitochondrial respiratory complexes I and II were deficient in skeletal muscle, a finding suggestive of an inborn error in mitochondrial biogenesis. Homozygosity mapping identified *IBA57* located in the largest homozygous region on chromosome 1 as a culprit candidate gene. *IBA57* is known to be involved in the biosynthesis of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. Sequence analysis of *IBA57* revealed the homozygous mutation c.941A > C, p.Gln314Pro. Severely decreased amounts of *IBA57* protein were observed in skeletal muscle and cultured skin fibroblasts from the affected subjects. HeLa cells depleted of *IBA57* showed biochemical defects resembling the ones found in patient-derived cells, including a decrease in various mitochondrial [4Fe-4S] proteins and in proteins covalently linked to lipoic acid (LA), a cofactor produced by the [4Fe-4S] protein LA synthase. The defects could be complemented by wild-type *IBA57* and partially by mutant *IBA57*. As a result of the mutation, *IBA57* protein was excessively degraded, an effect ameliorated by protease inhibitors. Hence, we propose that the mutation leads to partial functional impairment of *IBA57*, yet the major pathogenic impact is due to its proteolytic degradation below physiologically critical levels. In conclusion, the ensuing lethal complex biochemical phenotype of a novel metabolic syndrome results from multiple Fe/S protein defects caused by a deficiency in the Fe/S cluster assembly protein *IBA57*.

*To whom correspondence should be addressed at: Philipps-Universität Marburg, Robert-Koch Str. 6, 35032 Marburg, Germany.
Tel: +49 64212866449; Fax: +49 64212866414; Email: lill@staff.uni-marburg.de (R.L.); University Hospital Ghent, De Pintelaan 185, Ghent 9000, Belgium. Tel: +32 93323585; Fax: +32 93323875; Email: rudy.vancoster@ugent.be (R.V.C.)

[†]These authors contributed equally.

INTRODUCTION

The maturation of cellular iron-sulfur (Fe/S) proteins in eukaryotes is highly complex and involves more than 25 known biogenesis factors for the *de novo* synthesis of Fe/S clusters and their insertion into apoproteins (1,2). The biosynthetic process is initiated by the mitochondrial Fe/S cluster (ISC) assembly machinery that also performs a major role in the biosynthesis of cytosolic and nuclear Fe/S proteins. Maturation of the latter class of Fe/S proteins is assisted by the cytosolic Fe/S protein assembly (CIA) machinery (3). The components of both the ISC and CIA machineries are highly conserved from yeast to man, many of them being essential for cell viability, underscoring the vital importance of Fe/S clusters. In eukaryotic cells, essential Fe/S proteins encompass all replicative DNA polymerases (4), DNA primases, several DNA helicases (5) and the ABC protein ABCE1 required for ribosome assembly and protein translation (6).

The mitochondrial ISC assembly machinery consists of more than 15 different proteins best studied in yeast (7). The biogenesis pathway can be subdivided into three major steps. First, a [2Fe-2S] cluster is assembled *de novo* on the scaffold protein Isu1 (human ISCU). This step requires the production of sulfur from cysteine by the cysteine desulfurase complex Nfs1-Isd11 and frataxin (FXN) as a putative iron donor and/or regulator. Electron transfer mediated by the [2Fe-2S] ferredoxin (human FDX2) and ferredoxin reductase is thought to reduce sulfur to sulfide. In a second step, the [2Fe-2S] clusters are released from Isu1. Dissociation of the Fe/S clusters is facilitated by the mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 (human HSPA9) and its J-type co-chaperone Jac1 (HSC20). The Fe/S cluster may be bound transiently to the monothiol glutaredoxin 5 (GLRX5) from which it is targeted in a third step to dedicated Fe/S apoproteins with the help of various ISC targeting factors. For instance, IND1 (also termed NUBPL) (8,9) directs Fe/S clusters to respiratory complex I. NFU1 and BOLA3 deliver clusters to complex I, succinate dehydrogenase (SDH) and lipoic acid synthase (LIAS) (10,11). Either before or during the Fe/S cluster-targeting reactions, the [2Fe-2S] cluster synthesized on Isu1 is converted into the [4Fe-4S] form by a protein complex consisting of the A-type ISC proteins Isa1 (human ISCA1), Isa2 (ISCA2) and the folate-binding protein IBA57 (12,13).

More than 10 Fe/S proteins are present in the mitochondria. Seven of them are constituents of the respiratory complexes I-III. Five subunits (NDUFV1, NDUFV2, NDUF51, NDUF57 and NDUF58) located in the peripheral arm of complex I carry a total of eight Fe/S clusters (2 [2Fe-2S] and 6 [4Fe-4S]). The iron protein (Ip, SDHB) in complex II carries three clusters ([2Fe-2S], [3Fe-4S] and [4Fe-4S] types), whereas the Rieske Fe/S protein of complex III (UQCRCF1) contains a single [2Fe-2S] cluster exposed to the intermembrane space (14). In addition, the citric acid cycle enzyme aconitase (ACO2) and LIAS contain one and two [4Fe-4S] clusters, respectively.

Phenotypically diverse disorders have been reported as the result of deficiencies in distinct ISC assembly components. In the neurodegenerative disorder Friedreich's ataxia (MIM229300), the defect in the early acting ISC protein FXN is associated with diminished function of the respiratory

complexes I-III, lowered aconitase activity and mitochondrial iron accumulation (15). In contrast, a patient with a mutation in *GLRX5* presented with a sideroblastic anemia characterized by mitochondrial and cytosolic Fe/S protein defects and iron overload in mitochondria (MIM205950) (16). A muscle-specific splicing defect in the scaffold protein ISCU causes a myopathy with exercise tolerance and lactic acidosis (17,18). Biochemically, this is associated with cellular Fe/S protein deficiencies and altered iron homeostasis. Recently, pathogenic mutations in *BOLA3* (MIM613183) and *NFU1* (MIM608100) have been associated with defective Fe/S protein biosynthesis in patients presenting with respiratory chain defects, hyperglycinemia and low pyruvate dehydrogenase (PDH) complex activities (10,11). For these latter cases, no major effects on iron metabolism have been reported, a finding consistent with the late role of these ISC proteins in biogenesis (7). It is still unclear how these diverse clinical phenotypes arise from the underlying molecular Fe/S protein biogenesis defects.

Here, we report the first pathogenic mutation in the ISC assembly gene *IBA57* associated with a unique phenotype. Two siblings presented with a combined respiratory chain deficiency involving complex I and II, as well as defects in lipoate-containing enzymes and the citric acid cycle enzyme aconitase (ACO2). Biochemical studies in *IBA57*-depleted HeLa cells demonstrated that the mutated *IBA57* protein is rapidly degraded, suggesting that the complex disease phenotype can be biochemically explained by the severe maturation defect of mitochondrial [4Fe-4S] proteins arising from the *IBA57* functional deficiency.

RESULTS

The two siblings reported here became critically ill shortly after birth. They were born at term and were the first (P1) and second (P2) child from healthy young parents. The parents were first cousins of Moroccan origin. Prenatal ultrasound examination had shown intra-uterine growth retardation, polyhydramnios, microcephaly and an enlarged cerebral ventricle system in both siblings. Immediately after birth, P1 presented with severe hypotonia, generalized muscle weakness and absent primitive reflexes. The Apgar score was 4, 4 and 7, after 1, 5 and 10 min, respectively. His birth weight was 2580 g, length 48 cm and head circumference 30.5 cm (microcephaly). He had dysmorphic features, including retrognathia, high palate, widely spaced nipples, arthrogryposis of elbows, wrists, fingers and knees and showed signs of encephalopathy (Table 1). In blood, a metabolic acidosis, severely increased lactate concentrations and hyperglycinemia were detected. Blood cell count, hemoglobin and hematocrit were normal (Supplementary Material, Table S1). CK and transaminases were normal. Cerebral MRI showed white matter abnormalities, a hypoplasia of the corpus callosum, bilateral frontoparietal polymicrogyria, hypoplasia of the medulla oblongata and cytotoxic edema of the cortex affecting the left frontal and both occipital lobes (Fig. 1). Neonatal intensive care was started, but adequate supportive treatment was ineffective as the clinical condition further deteriorated. Intensive neonatal care was stopped at

Table 1. Clinical, radiological and biochemical data in both siblings

	P1	P2
Clinical data		
Gender	Male	Female
Birth weight, length and head circumference	2580 g, 48 cm and 30.5 cm	2240 g, 48 cm and 30.5 cm
APGAR (at 1, 5 and 10 min)	4, 4 and 7	1, 4 and 1
Prenatal clinical presentation	IUGR, brain malformations and polyhydramnios	IUGR and polyhydramnios
Postnatal clinical presentation	Severe hypotonia, generalized muscle weakness, absent primitive reflexes, microcephaly and dysmorphic features (retrognathia, high palate, widely spaced nipples, arthrogryposis of elbows, wrists, fingers and knees)	Severe hypotonia, apnea and arthrogryposis
Radiological data		
Brain MRI	Cerebral atrophy, bilateral perisylvian and frontoparietal polymicrogyria, severely hypoplastic corpus callosum, frontal and occipital cortical cytotoxic edema and hypoplastic medulla oblongata	ND
MR spectroscopy (basal ganglia)	↑Choline, ↑Lactate, ↓N-acetylaspartate	ND
Biochemical data (normal values)		
Serum		
Lactate (<2.0 mmol/l)	7.3	ND
Lactate/pyruvate ratio (6–26)	150	ND
Glycine (2.2–14.2 µmol/l)	58	ND
CSF		
Lactate (0.45–2.1 mmol/l)	5.5	ND
Glycine (0.7–14.7 µmol/l)	71.4	236
Urine		
Malate (5–36 µmol/mmol creatinine)	147	ND
Tiglylglycine (undetectable)	34 ^a	ND
Beta-aminoisobutyric acid (<87 mmol/mol creatinine)	3126	ND
Lysine (22–171 mmol/mol creatinine)	226	ND

IUGR, intrauterine growth retardation; ND, not determined; CSF, cerebrospinal fluid.

^aActivity is expressed as micromoles per millimole creatinine.

day six. The phenotype of neonatal hypotonia leading to early demise associated with high glycine in cerebrospinal fluid (CSF) initially pointed at the diagnosis of glycine encephalopathy due to non-ketotic hyperglycinemia. Molecular analysis of the genes coding for glycine decarboxylase (*GLDC*, MIM238300) and aminomethyltransferase (*AMT*, MIM238310), however, did not reveal any coding region mutation. More molecular genetic investigations revealed a homozygous pathogenic mutation in *IBA57* that prompted effective investigations in the second sibling confirming prenatally the same homozygous mutant genotype. As the parents decided against selective interruption of the pregnancy, a girl was born at term. Her body weight was 2240 g, length 48 cm and head circumference 30.5 cm. Apgar scores were 1, 4 and 1, at 1, 5 and 10 min, respectively. She showed poor reactivity and was severely hypotonic. In accordance with the parents, only comfort therapy was provided. This patient died within the first 15 min after birth due to hypoventilation and low cardiac activity.

Based on the clinical presentation predominantly characterized by severe hypotonia associated with hyperlactacidemia, a respiratory chain defect was suspected. Spectrophotometric analysis of the respiratory chain enzymes in skeletal muscle revealed deficient catalytic activities of complexes I and II in either sibling (Table 2). The activities of complex III were normal. The activity of complex IV was deficient in P2

and low normal in P1. In cultured skin fibroblasts from both patients, a significantly reduced activity for complexes II and IV was found (complex I not measured). The activity of complex III was not significantly diminished.

Activity staining of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes in the blue native-polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) gel using mitochondria isolated from skeletal muscle confirmed the catalytic deficiency of complexes I and II in both infants (Fig. 2A). The activity staining for complexes III and V was comparable to that in controls. Staining for complex IV activity was only slightly decreased in both individuals. The amount of all five OXPHOS complexes was quantitated in skeletal muscle by western blotting using a mixture of specific antibodies directed against one subunit of each complex. In both siblings, severely decreased signals for complexes I, II and IV subunits were detected in skeletal muscle, whereas the signals for complexes III and V were preserved (Fig. 2B). Together, these findings are in accordance with the spectrophotometric results (Table 2).

The respiratory chain defects, in combination with the clinical findings, the increased glycine levels in CSF and serum and the absence of mutations in non-ketotic hyperglycinemia genes (*GLDC* and *AMT*) generated the hypothesis that an inborn error in the ISC biosynthesis pathway may be the cause of the lethal metabolic disorder. Homozygosity

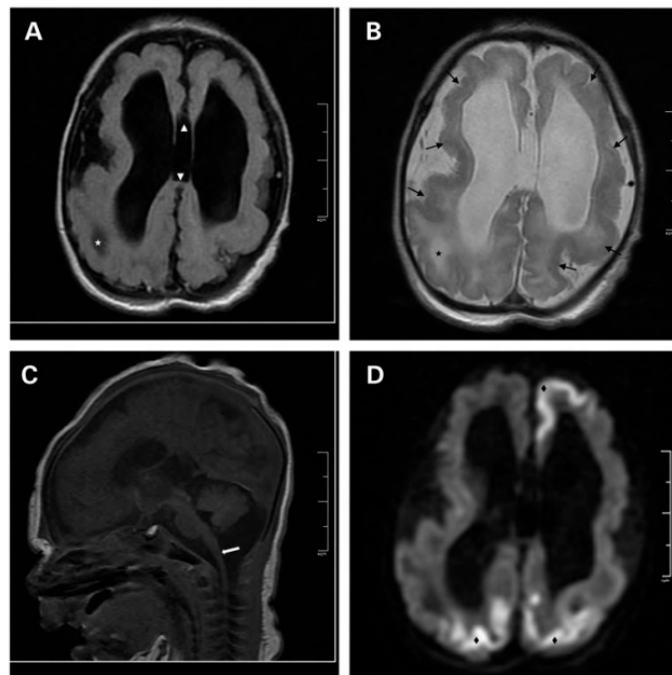


Figure 1. Brain MRI of subject P1. Representative images of cerebral MRI abnormalities of P1 illustrating white matter abnormalities (A, star), hypoplastic corpus callosum (A, white arrowheads) on axial FLAIR images, bilateral frontoparietal polymicrogyria (B, thin black arrows) on T2 weighted images, hypoplastic medulla oblongata (C, large white arrow) on sagittal T1 weighted images and left frontal and bilateral occipital cytotoxic edema of the cortex (D, black diamonds) on diffusion weighted images.

mapping of P1 revealed six homozygous regions. These were screened for the presence of genes involved in ISC biosynthesis (7). One of these genes, *IBA57*, was present in the largest homozygous region located on chromosome 1. Mutation analysis of *IBA57* revealed a homozygous mutation, (c.941A > C leading to p.Gln314Pro; ENST00000366711) in both individuals. The same mutation was identified in both parents in a heterozygous state (Fig. 3), but was not present in the 1000 Genomes Project (December 2011) (<http://www.1000genomes.org/>) or in the Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), nor in 186 Moroccan control alleles. The Gln314 residue of *IBA57* is not conserved in eukaryotes, not even in vertebrates, and is located in a non-conserved region of the protein (Supplementary Material, Fig. S1). For structural modeling attempts, we used *Escherichia coli* YgfZ and related structures as templates (19). *E. coli* YgfZ and human *IBA57* share a stretch of 43 residues with 42% identity, yet the remainder sequence shows hardly any conservation, particularly not in the mutated region. Nevertheless, modeling indicated that the mutated residue may be located in a loop structure close to the surface. However, depending on the template used for modeling, the location of the mutated residue differed substantially within the loop, thus, precluding any predictions on possible conformational effects of the mutation.

To verify the causal nature of the *IBA57* mutation for the disease phenotype, we first analyzed the consequence of the mutation on the cellular amounts of *IBA57*. The protein was hardly detectable by western blotting of mitochondrial extracts from skeletal muscle and cultured skin fibroblasts of both siblings (Fig. 4A). Immunofluorescence staining of cultured skin fibroblasts showed a severely decreased signal of *IBA57* in mitochondria of both siblings when compared with control cell lines (Fig. 5A–I). These data support the idea that the mutation in *IBA57* might be causative of the disease phenotype.

We next analyzed the amount of complex II that is a maturation target of *IBA57* (12). Immunofluorescence staining for SDHB (subunit of complex II) revealed a significant decrease in complex II in both siblings when compared with control skin fibroblasts (Fig. 5J–R). Because *IBA57* was shown to be required for maturation of the mitochondrial Fe/S protein LIA5 (12,20), we tested the lipoic acid (LA) content of the two mitochondrial enzymes α -ketoglutarate dehydrogenase (α KDH) and PDH (21) by western blotting using a LA-specific antibody in mitochondrial extracts isolated from skeletal muscle and cultured skin fibroblasts. A severe decrease in lipoylated proteins was found in both subjects (Fig. 4B). Together, these results are fully compatible with the hypothesis of a mutated *IBA57* being the causal agent of the disease phenotype triggering defects in mitochondrial Fe/S protein assembly.

Table 2. Respiratory chain activities in different tissues from the two siblings measured by spectrophotometric analysis

Tissue	Complex I/CS	Complex II/CS	Complex II + III/CS	Complex III/CS	Complex IV/CS	Citrate synthase ^a
Skeletal muscle (homogenate)						
P1	0.32 (−5.39)	0.30 (−9.39)	0.39 (−7.19)	0.90 (0.08)	0.89 (−1.78)	143
P2	<0.10	0.13 (−13.68)	0.45 (−5.36)	0.74 (−2.14)	0.75 (−4.22)	103
Controls (n = 30)	0.64 ± 0.06	0.68 ± 0.04	0.68 ± 0.04	0.89 ± 0.07	1.00 ± 0.06	174 ± 70
Cultured skin fibroblasts (homogenate)						
P1	ND	0.10 (−10.11)	0.34 (−4.51)	0.68 (−2.74)	0.66 (−6.09)	111
P2	ND	0.30 (−6.10)	0.13 (−7.57)	0.71 (−2.33)	0.64 (−6.35)	85
Controls (n = 30)	ND	0.61 ± 0.05	0.66 ± 0.07	0.87 ± 0.07	0.96 ± 0.05	82 ± 15

CS, citrate synthase, ND, not determined.
^aSpecific activity expressed as nanomoles of substrate per minute per milligram of protein. All other data are expressed as the logarithm of OXPHOS activity divided by the logarithm of citrate synthase activity (Z-score). The Z-score is calculated as the activity ratio for the patient sample minus the mean activity ratio for the control samples divided by the SD for the control samples. Control sample ratios are given as mean ± SD. Deficient activities are considered when the Z-score is < −3.0. Deficient activities are shown in bold.

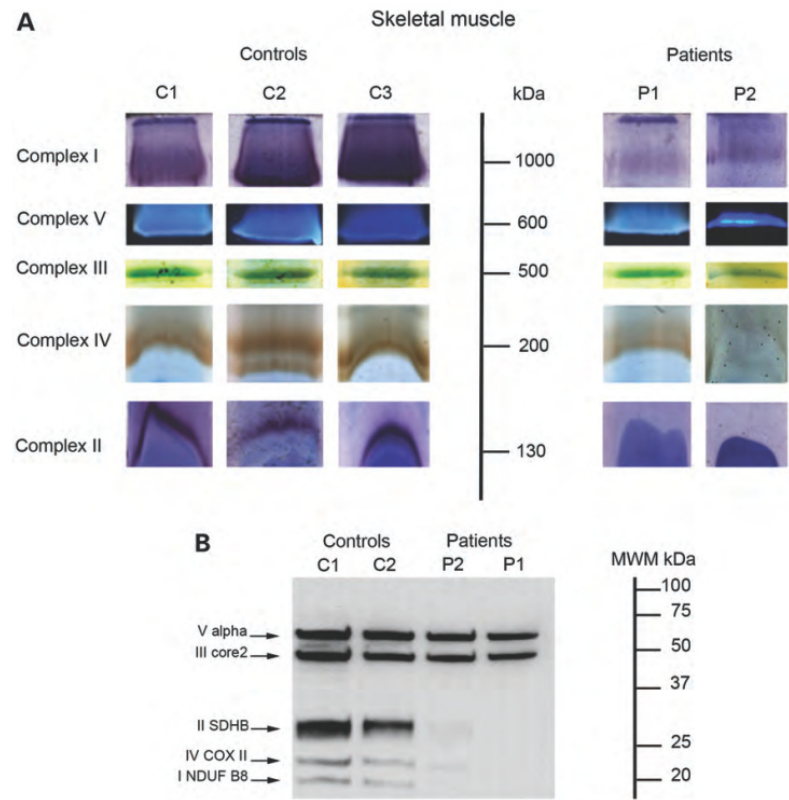


Figure 2. Mitochondria of affected IBA57 individuals show severe defects in specific respiratory complexes. **(A)** In gel activity staining of complex I, II, III, IV and V from skeletal muscle mitochondria after their separation by BN-PAGE. P1 shows clearly reduced activity of complex I and II and slightly reduced activity of complex IV, when compared with control skeletal muscle. P2 shows clearly reduced activity of complex I, II and slightly reduced activity of complex IV when compared with control skeletal muscle. The activities of complexes V and III were not decreased. **(B)** Immunoblot of mitochondrial proteins isolated from skeletal muscle using a mixture of antibodies against complex I (NUDFB8), complex II (SDHB), complex III (UQCRC2), complex IV (MT-CO2) and complex V (ATP5A1). Both individuals show reduced signals for complex I, II and IV when compared with control samples. The signal for complex III and V is preserved in both individuals.

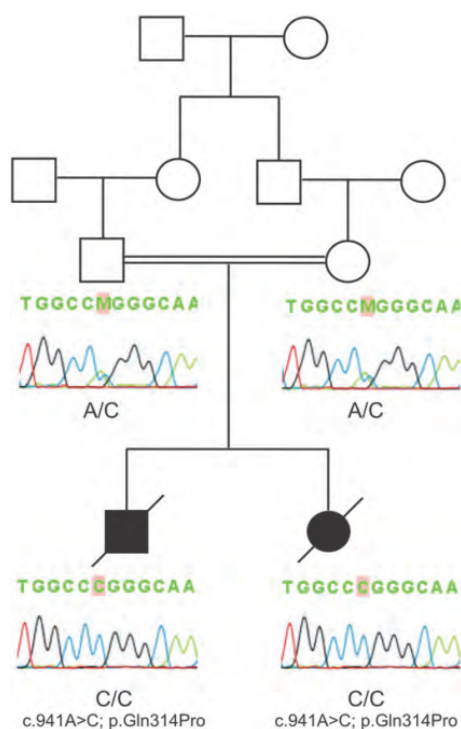


Figure 3. Family pedigree and chromatograms. Family pedigree indicating the segregation of the mutation c.941A > C from the father (heterozygous) and the mother (heterozygous) to the two affected children who are homozygous for the mutation. The chromatograms are shown underneath each individual and the mutation status is indicated below the chromatogram (square: male; circle: female; open symbols: unaffected; filled symbols: affected; the two patients died shortly after birth are indicated by a diagonal line).

To independently test this hypothesis, an RNAi-mediated depletion of *IBA57* in human cell culture was used (12). RNAi-treated HeLa cells were co-transfected with equal amounts of expression plasmids encoding either the wild-type *IBA57* protein or *IBA57* carrying the Q314P exchange. The RNAi treatment strongly depleted mitochondrial *IBA57*, whereas the levels of α -subunits (ATP5A1) and β -subunits (ATP5B) of mitochondrial complex V and cytosolic tubulin remained unchanged (Fig. 6A). RNAi-treated cells co-transfected with the *IBA57* expression plasmids produced similar levels of mutated *IBA57*_Q314P and more than 10-fold higher amounts of wild-type *IBA57* when compared with endogenous protein (Fig. 6A). Both plasmid-borne proteins were predominantly located in the mitochondria-containing fraction.

The depletion of *IBA57* was associated with significant defects in the enzyme activities of the [4Fe-4S] cluster-containing mitochondrial aconitase (ACO2, mtAco) and complex II (residual activities of 55 and 16%, respectively; Fig. 6B). Moreover, the activity of complex IV (cytochrome *c* oxidase), which does not contain a Fe/S cluster, was decreased

to 42% of control values. An effect of *IBA57* depletion on complex IV activity has been reported previously for both yeast and human cells (12,20). All the monitored enzyme activities were partially restored on co-transfection with wild-type *IBA57*. In contrast, mutated *IBA57*_Q314P was hardly effective in reversing the loss in enzyme activities (Fig. 6B).

Severe decreases in the maturation of mitochondrial Fe/S proteins are often associated with a diminution of their protein levels and likely result from degradation of the apoproteins during longer times of defective maturation. Such an effect has also been reported for depletion of *IBA57* (12). Immunostaining of *IBA57*-depleted cell extracts for respiratory complexes II and IV revealed a significant decrease in the latter proteins, whereas the levels of mitochondrial aconitase (ACO2) and respiratory complexes I and III were only mildly affected (Fig. 6C and Supplementary Material, Fig. S2). As expected, the level of the mitochondrial [2Fe-2S] protein ferrochelatase (FECH) was not diminished by *IBA57* depletion. Plasmid-assisted synthesis of wild-type *IBA57* restored the depleted Fe/S protein levels efficiently. Likewise, mutant *IBA57*_Q314P was almost fully capable of complementing the Fe/S protein levels (Fig. 6C and Supplementary Material, Fig. S2). This indicates that the mutated *IBA57* protein retained some residual maturation activity and partially restored the severe Fe/S protein assembly defect. Nevertheless, the mutated protein was still unable to restore the enzyme activities indicating a partial functional impairment. We next measured the LA content of α KDH and PDH after RNAi-mediated *IBA57* depletion. The strong decrease in LA content of the E2 proteins of these complexes on *IBA57* depletion was fully compensated by expression of both wild-type and mutant *IBA57* (Fig. 6C and Supplementary Material, Fig. S2). Taken together, these findings suggest that the mutated *IBA57* retained residual functionality in Fe/S protein biogenesis, a finding consistent with the non-conserved nature of the exchanged residue.

IBA57 is a late-acting protein of the ISC assembly machinery (7,12,20). Hence, its functional depletion is not expected to be associated with an impact on the maturation of cytosolic-nuclear Fe/S proteins and on iron homeostasis, as this is the case for members of the core ISC assembly machinery (1,15,16,22). Consistent with this expectation, hematocrit and hemoglobin parameters in Patient 1 showed no significant deviation from control values (Supplementary Material, Table S1). We next estimated the amounts of the cytosolic Fe/S protein glutamate phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase (GPAT) on RNAi-mediated *IBA57* depletion in HeLa cells. GPAT protein levels are a direct measure of the efficiency of cytosolic Fe/S protein biogenesis (23). No GPAT diminution was seen on *IBA57* depletion. We then tested the effects of *IBA57* depletion on the activity and level of the cytosolic [4Fe-4S] cluster-containing aconitase (ACO1, cytAco) also referred to as iron regulatory protein 1 (IRP1). CytAco activity was mildly affected to 70% of control values in *IBA57*-depleted cells, whereas protein levels were unchanged. The slightly decreased cytAco activity could not significantly be complemented by expression of wild-type or mutant *IBA57*. In all likelihood, the subtle effect on cytAco activity is an indirect result of the *IBA57* depletion, similar to previously observed effects for deficiencies

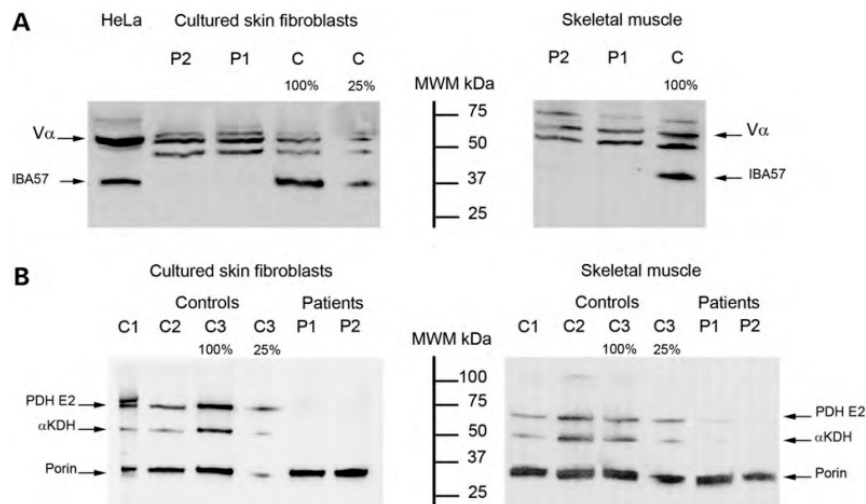


Figure 4. IBA57 and lipoylated proteins are severely decreased in cells of affected IBA57 individuals. (A) Immunoblot of mitochondrial proteins isolated from skeletal muscle and cultured skin fibroblasts from both individuals shows a severely reduced signal for IBA57 protein, below 25% of the control sample. Antibodies against complex V subunit alpha (ATP5A1) were used as loading control. With this antibody, two additional bands were detected. (B) Immunoblot using antibodies against lipoylated residues in skeletal muscle and cultured skin fibroblast mitochondrial extracts. Both individuals showed a severely reduced signal for the bands corresponding to the lipoylated residues PDH-E2 and α KDH-E2. Antibodies against porin were used as loading control.

in ISCA1 and ISCA2 (12). Finally, we measured the level of IRP2, another key protein for regulation of iron homeostasis via post-transcriptional control of various target mRNAs. Whereas IRP1 uses its Fe/S cluster for iron sensing, IRP2 does not assemble an Fe/S cluster, yet is degraded under iron-replete conditions. Its level, therefore, is an indirect measure of cytosolic iron concentration (2). The amount of IRP2 was not altered significantly on IBA57 depletion indicating no major change in cytosolic iron availability (Fig. 6C and Supplementary Material, Fig. S2). Collectively, our results show that IBA57 deficiency does not significantly affect cytosolic Fe/S protein biogenesis and cellular iron metabolism.

Because our data showed that mutated IBA57 retained some activity, we asked what may be the reason for the severe functional defects in the affected individuals. As shown above, mutant mitochondria from both affected individuals contain low amounts of IBA57 when compared with controls (Fig. 4A). Moreover, parallel expression of wild-type and mutant IBA57 from equal amounts of plasmid led to much lower levels of mutant protein in HeLa cell culture (Fig. 6). We, therefore, reasoned that the mutation might lead to proteolytic sensitivity of IBA57 and a protein decay below functionally critical levels. We, therefore, tested the effect of membrane-permeable protease inhibitors on the levels of a myc-tagged version of mutant IBA57_Q314P. Addition of Pefabloc or MG132, which are known to inhibit the major mitochondrial matrix protease PIM1 (24), largely increased the levels of IBA57_Q314P-myc in a time- and inhibitor concentration-dependent fashion (Fig. 7A). In contrast, endogenous, nuclear-encoded IBA57 was unaffected. This result clearly indicated that IBA57_Q314P is susceptible to proteolysis and can be stabilized by addition of protease

inhibitors, whereas the wild-type protein apparently has a low turnover rate.

We finally tested whether the increased levels of mutated IBA57_Q314P in the presence of Pefabloc may influence the efficiency of Fe/S protein maturation. To this end, we performed the RNAi-mediated depletion and complementation experiment described in Figure 6 in the presence of Pefabloc for 16 h that yields a 3-fold higher level when compared with endogenous IBA57. The activity of respiratory complex II was restored to almost control levels (Fig. 7B). Activities of mitochondrial aconitase (ACO2) and respiratory complex IV were only slightly improved by addition of Pefabloc. As seen above, the diminished levels of complex II subunits and the LA content of α KDH and PDH subunits were restored on production of wild-type and mutant IBA57 and in the presence of Pefabloc (Supplementary Material, Fig. S3). Taken together, these findings clearly indicate that the mutated IBA57 retains some, but not full functionality. Importantly, the mutated protein is highly sensitive to proteolysis and, thus, may be degraded in affected individuals below functionally critical levels.

DISCUSSION

Our report shows that a homozygous mutant genotype in IBA57 causes a metabolic syndrome apparent before birth and lethal in early infancy. Besides immediately apparent components, including hypotonia, respiratory insufficiency and congenital microcephaly, the syndrome is also characterized by hyperglycinemia and brain malformations (Table 1; Fig. 1). Parental consanguinity and double occurrence of the

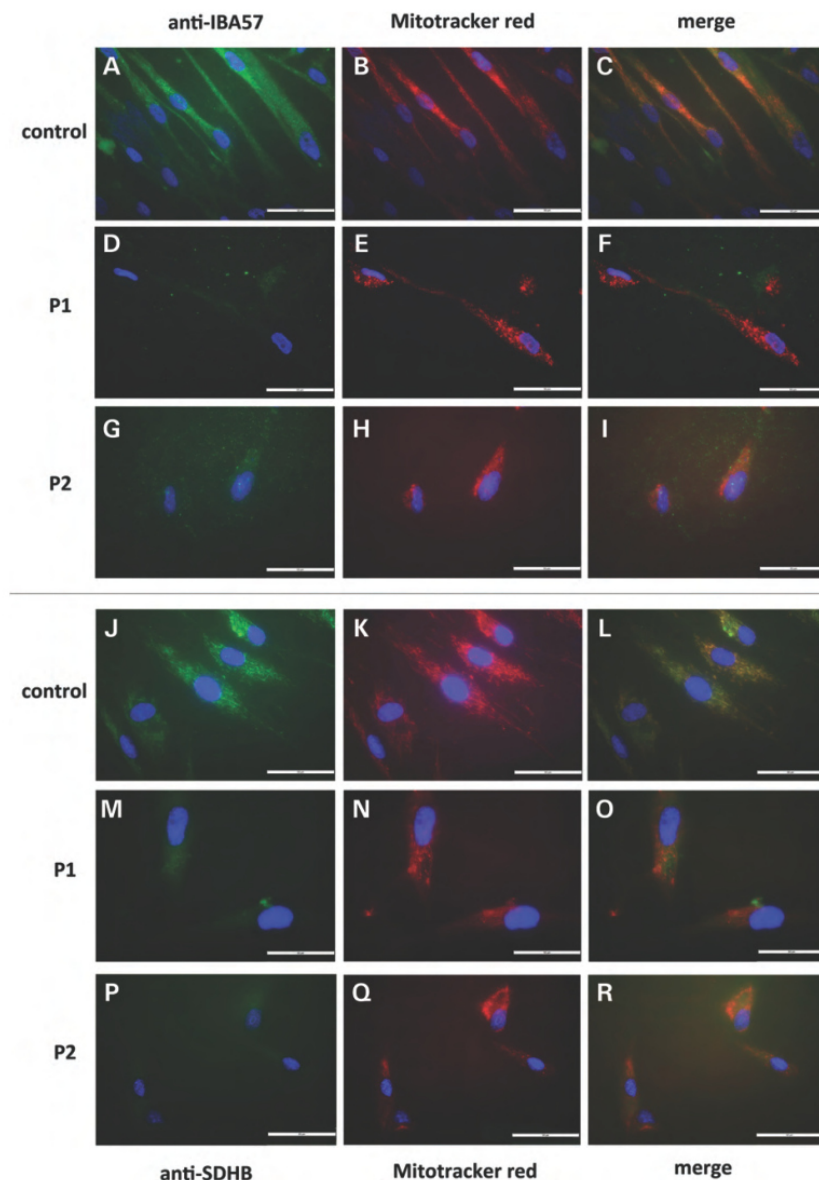


Figure 5. Immunofluorescence staining of cultured skin fibroblasts reveals decreased levels of IBA57 and respiratory complex II. The first row shows a control cell line treated with anti-IBA57 antibodies (A), Mitotracker red (B) and a merged figure (C). The second and third row represent skin fibroblasts from, respectively, P1 and P2 treated with anti-IBA57 (D and G), Mitotracker red (E and H) and a merged figure revealing IBA57 deficiency (F and I). The fourth row shows again a control cell line treated with anti-SDHB antibodies (complex II subunit) (J), Mitotracker red (K) and a merged figure (L). The fifth and sixth row, respectively, show P1 and P2 treated with anti-SDHB (M and P), Mitotracker red (N and Q) and a merged figure revealing complex II deficiency (O and R). Scale bar represents 50 μ m.

disorder in the sibship show that the mode of inheritance is autosomal recessive and implies a one in four probability of recurrence in the family. The clinical picture of the probands

presented here resembles that of three siblings with *NFU1* defect, designated as multiple mitochondrial dysfunction syndrome 1 (MMDS1, MIM605711) (10). These *NFU1*-deficient

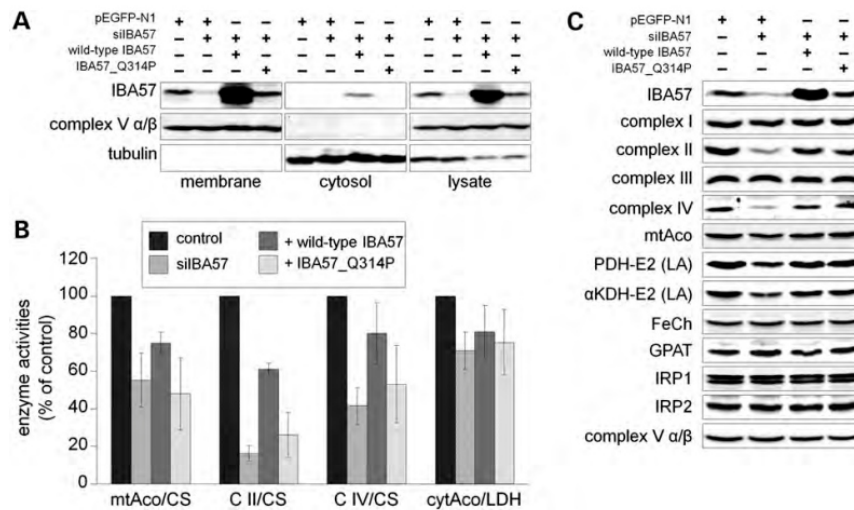


Figure 6. Mutated IBA57_Q314P partially restores the functional defects of IBA57-deficient cells. HeLa cells were transfected thrice at a 3 day interval with siRNA against the mRNA of *IBA57* (silBA57) and with plasmids encoding wild-type or mutant IBA57 (IBA57_Q314P), or with the control vector pEGFP-N1. (A) After the third transfection (9 days of growth), cells were harvested, fractionated by digitonin treatment and centrifugation at 15 000g into a soluble (cytosol) and a membrane fraction containing mitochondria. Proteins were analyzed by SDS PAGE and western blotting using an antibody against IBA57, the α/β subunits of respiratory complex V (ATP5A1 and ATP5B) and tubulin. The plasmid-borne expression yielded more than 10-fold higher levels when compared with endogenous IBA57 protein while synthesis of IBA57_Q314P generated similar amounts of IBA57 as control cells. (B) The cell fractions from part A were analyzed for the enzyme activities of mitochondrial aconitase (ACO2, mtAco), respiratory complexes II and IV and cytosolic aconitase (ACO1, cytAco, IRP1). Values are given relative to the activity of mitochondrial citrate synthase or cytosolic lactate dehydrogenase and are normalized to the ratios for control cells. Data are presented as mean \pm SD ($n = 4$). (C) Cell extracts were subjected to SDS PAGE and western blotting using antibodies against the indicated proteins. The LA-containing PDH-E2 and α KDH-E2 subunits of mitochondrial PDH and α KDH were visualized by immunostaining against LA. A representative result is shown.

infants presented with feeding difficulties, muscular weakness, respiratory insufficiency, lethargy and lack of responsiveness from the first days of life and died within the first month of life. Navarro-Sastre *et al.* reported 10 more infants with *NFU1* mutations with a slightly less severe phenotype. So far, only one boy was reported with a genetic defect in *BOLA3* designated as MIM614299 (10). The latter patient presented with signs of encephalopathy at the age of 4 months and succumbed at the age of 11 months.

The biochemical profile of individuals with defects in IBA57 is both similar to and distinct from that reported for functional deficiencies in *NFU1* or *BOLA3* (10,11). IBA57 defects are associated with a general mitochondrial [4Fe-4S] protein defect, including respiratory complexes I and II, aconitase and LIAS. Functional impairment of the latter enzyme in turn explains the increase in glycine in serum and CSF, as seen in the probands presented here and in the individuals with pathogenic mutations in *NFU1* and *BOLA3*. In contrast, mutations in *NFU1* and *BOLA3* do not affect the [4Fe-4S] protein aconitase. This has prompted the model of IBA57 assisting the generation of [4Fe-4S] clusters while *NFU1* and *BOLA3* serve as specific ISC targeting factors (7). The biochemical phenotypes of mutations in *IBA57*, *NFU1* and *BOLA3* differ characteristically from mutations in *FXN*, *GLRX5* and *ISCU* (15–18). Cells defective in these core ISC machinery proteins show, in addition to general mitochondrial [2Fe-2S] and [4Fe-4S] protein defects, a strong impairment in cytosolic

Fe/S protein maturation and a severe cellular iron accumulation as a consequence of diminished IRP1 maturation and hence activation of its iron-responsive element binding. These latter effects are not seen in individuals with mutations in *IBA57*, *NFU1* and *BOLA3*. Thus, these observations fit well with the current view of IBA57, *NFU1* and *BOLA3* serving as late-acting components of the mitochondrial ISC assembly machinery lacking a detectable maturation function for mitochondrial [2Fe-2S] and extra-mitochondrial Fe/S proteins, as well as for cellular iron regulation, thus distinguishing these components from the core ISC members (1,7). Notably, most ISC biosynthesis defects are associated with a severe combined catalytic impairment of complexes I and II. For many mitochondrial diseases, this is an unusual finding, as in most combined OXPHOS deficiencies, nucleus-encoded complex II is functionally preserved, yet a defect of complexes I and IV is seen. These effects are caused either by mutations in the mitochondrial DNA, or, more rarely, by mutations in nuclear genes encoding mitochondrial transcription or translation factors. Altogether, these characteristic features may help in phenotypically identifying new ISC biosynthesis defects.

The mutation in *IBA57* reported here may have an impact on the protein stability. Structural modeling indicated that the mutated residue may lie in a loop at the surface of the protein. In fact, western blotting and immunofluorescence experiments found the protein to be severely decreased in patient-derived mitochondria. Moreover, gene expression

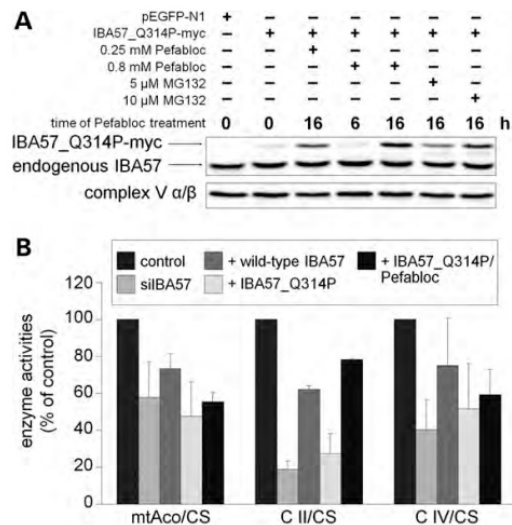


Figure 7. Mutated IBA57_Q314P is sensitive to proteolysis, yet partially functional. (A) HeLa cells were transfected with either a plasmid encoding myc-tagged mutant IBA57 (IBA57_Q314P-myc) or with the control vector pEGFP-N1. Cells were grown for 3 days. As indicated, the protease inhibitors Pefabloc and MG132 were added 6 h or 16 h before harvesting. Cell extracts were analyzed for IBA57 or IBA57_Q314P-myc by western blotting using an IBA57-specific antibody. (B) HeLa cells were transfected, grown and analyzed as in Figure 6. After 8 days, 0.8 mM Pefabloc was added to one set of cells expressing IBA57_Q314P, and cells were harvested 16 h later. Mitochondria-containing fractions were analyzed for the enzyme activities of mitochondrial aconitase (ACO2, mtAco) and respiratory complexes II and IV relative to the activity of citrate synthase.

studies in HeLa cells showed that the levels of mutated IBA57 protein were significantly lower than the wild-type copy. Thus, the mutation mainly affects IBA57 protein stability leading to rapid degradation. This conclusion was strongly supported by inhibition of the mitochondrial protease PIM1 in HeLa cells that substantially increased the amount of mutant IBA57. The elevated amounts of IBA57 were still unable to fully restore the activity of ISC-dependent enzymes, yet the protein was partially functional as deduced from the regeneration of wild-type levels of affected Fe/S proteins. Such an effect, i.e. decreased Fe/S protein activity, but not yet diminished levels of apoproteins, is usually seen on less severe impairment of the maturation pathway. In conclusion, the major disease-causing effect may arise from the degradation of IBA57 below physiologically critical amounts, rather than from a complete dysfunction of the altered IBA57 protein.

IBA57 has been shown to play an important role in Fe/S protein biogenesis in yeast (20). In *E. coli*, suppression of an IBA57-related protein (named YgfZ) resulted in deficiency in some Fe/S proteins, including SDH (25). In IBA57-depleted HeLa cells, steady-state levels of several ISC proteins were affected, including subunits of complex I (NDUFA9, NDUFA13, NDUFB4 and NDUFS3), complex II (SDH) and complex IV (MT-CO2) (12). Catalytic activities of complex I and II were compromised. These results correlate well with the diminished activities and levels of several Fe/S proteins

tested in our individuals. Notably, the activity of the [2Fe-2S] cluster-containing complex III was not affected in these individuals consistent with the previously suggested lack of function of IBA57 in [2Fe-2S] cluster formation (12,20).

A rather surprising finding was that in IBA57-deficient mitochondria from the two siblings also complex IV was severely decreased, although this complex does not contain any ISC-carrying subunits. However, this result is not unexpected because lowered COX2 steady-state levels have been reported in Isa protein-depleted yeast cells (13) and in ISCA or IBA57-depleted HeLa cells (12). Such adverse effects are not due to compromised heme biosynthesis (12,26) and are unlikely to be caused by impaired heme A production. The latter pathway depends on the [2Fe-2S] ferredoxin that is unaffected during maturation in Isa-Iba57-deficient yeast cells and possibly also in human cells (13,22). Why complex IV is affected on loss of ISCA-Iba57 function remains unknown at present. The failure to assemble complex I does not provide a reasonable explanation because normal complex IV activities were found in complex I assembly defects caused by depletion of IND1 (9).

Defects in the ISC biosynthesis pathway not only have a negative effect on the respiratory complexes but also on LA-containing proteins, likely as a result of a defect in the maturation of the [4Fe-4S] protein LIA5. Pathogenic mutations in *BOLA3* and *NFU1* (10,11) have been shown to be associated with decreased amounts of proteins carrying a LA residue. LA is required exclusively in mitochondria. In human cells, four mitochondrial proteins bear a LA residue. They include the E2 components of PDH complex (PDH-E2), α -KDH, a branched-chain keto acid dehydrogenase (BCKDH) and the H protein of the glycine cleavage system (H-GCS). BCKDH and H-GCS are expressed mainly in liver (27,28), the reason why these proteins cannot be demonstrated in normal cultured skin fibroblasts or in normal skeletal muscle. A defect in the glycine cleavage system explains the increase in the glycine concentrations in the affected individuals. Earlier studies in yeast have shown that Iba57 plays a role in the maturation of [4Fe-4S] cluster-bearing radical S-adenosyl-L-methionine enzymes, including LIA5 (20). In the two siblings presented, the lipoylated groups in PDH-E2 and α -KDH-E2 were significantly decreased in mitochondrial proteins isolated from cultured skin fibroblasts and skeletal muscle tissue.

In conclusion, the genetic and biochemical analyses in the two siblings studied here show that the molecular cause of the pathogenic defects is a homozygous mutation in *IBA57*, a gene that codes for a protein involved in biosynthesis of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. The mutation leads to an IBA57 protein that is partially functionally impaired and additionally is effectively degraded below physiologically relevant amounts.

MATERIALS AND METHODS

Spectrophotometric analysis

Spectrophotometric analysis was used for measurement of the catalytic activities of citrate synthase, lactate dehydrogenase

and the mitochondrial respiratory complexes in skeletal muscle (complexes I, II, II + III, III and IV), cultured skin fibroblasts (complexes II, II + III, III and IV) and HeLa cells (complexes II and IV). For the latter, also aconitase was measured. Analyses were performed according to previously described methods (29–37).

In-gel activity staining following separation of respiratory complexes by BN-PAGE

BN-PAGE was used to separate and visualize the respiratory complexes in mitochondria isolated from skeletal muscle. Solubilization of the complexes, BN-PAGE and staining of their catalytic activities in the gel were performed as reported earlier (38). Patient and control samples were loaded in duplicate using equal amounts of mitochondrial protein (50 µg).

Mitotracker and immunofluorescent staining

Skin fibroblasts grown onto glass chamber slides were incubated with 25 ng/ml Mitotracker red CMXRos (Invitrogen) for 45 min at 37°C. Subsequently, they were fixed in 3.5% paraformaldehyde for 15 min at 37°C and permeabilized for 3 min in ice-cold acetone. Slides were rehydrated in phosphate-buffered saline (PBS) and subsequently blocked with 5% bovine serum albumin in PBS for 30 min. Slides were incubated with monoclonal antibodies directed against OXPHOS complex II subunit SDHB (MS203, 20 µg/ml) and rabbit polyclonal anti-IBA57 (crude rabbit serum, diluted 1 of 10), for 3 h at room temperature. Appropriate secondary antibodies labeled with AlexaFluor488 (Invitrogen) were added and slides were washed with PBS in between incubations. Slides were mounted with vectashield containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (Vector, Burlingame, CA, USA) and evaluated under a fluorescence microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

Western blot analysis

Mitochondrial fractions were isolated from skeletal muscle and cultured skin fibroblasts. Proteins were solubilized and subsequently separated by tricine SDS PAGE. Western blotting was performed using a mixture of antibodies directed against one subunit in each of the five respiratory complexes: NDUFB8 for complex I, SDHB for complex II, core2 for complex III (UQCRC2), MT-CO2 for complex IV and subunit alpha for complex V (ATP5A1) (MS601–360 MitoProfile® human total OXPHOS complexes detection kit, 1.5 µg/ml, MitoSciences, OR, USA). For visualization of IBA57 protein, a polyclonal antibody was raised in rabbits by injection of recombinant IBA57 purified from *E. coli* (12). LA-containing proteins were detected by western blotting using an antibody against protein-bound LA (ab58724, 1 of 7500, Abcam, Cambridge, UK) (20,21). Detection was achieved by the use of the ECL Plus™ enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare, Diegem, Belgium), as described previously (39). A ChemiDoc charge-coupled device camera was used to capture the signals that were processed using Quantity One® software (Bio-Rad, Nazareth, Belgium). HeLa cell extracts were analyzed using the following

antibodies: NDUFA9 for complex I, SDHB for Complex II (both from MitoSciences, USA), UQCRCFS1 for Complex III, MT-CO2 for complex IV and ATP5A1 for complex V (gift from Schagger H. and Wittig I.), ACO2 (Thermo Scientific), tubulin (clone DM1A; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), LA (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), FECH (gift from Dailey H.A. and T.), GPAT (gift from Puccio H.) and IRP1 and IRP2 (gift from Eisenstein R.).

Homozygosity mapping

Single-nucleotide polymorphism genotyping was performed using the Illumina HumanCytoSNP-12v2.0 BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). The chip was scanned on an iSCAN system, and image data were normalized using the genotyping module from the GenomeStudio analysis software according to the protocol provided by the manufacturer (Illumina Inc.). Homozygous regions were determined with the VanillaICE algorithm (40) that has been incorporated in our analysis platform CNV-WebStore (41). All data were mapped using Human Genome Build hg19.

Mutation analysis

DNA was extracted from the parents and neonates using standard procedures. PCR reactions were carried out using primers and conditions described in Supplementary Material, Table S2. All PCR products were purified using alkaline phosphatase (Roche, 20 U/µl) and exonuclease I (New England Biolabs, 20 000 U/ml) to remove excess dNTPs and primers. Subsequent sequencing of the PCR products was carried out using the Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Products were separated on an ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequence variants were identified based on *IBA57* transcript ENST00000366711 for reference using the first nucleotide of the start codon (ATG) as position +1.

Site-directed *in vitro* mutagenesis

Site-directed *in vitro* mutagenesis was carried out to introduce the c.941 A > C mutation into the commercially available myc-DDK tagged human *IBA57* cDNA clone (RC211947, Origene). Primers were designed using the Quickchange Primer design tool (eResources, Agilent Technologies; Supplementary Material, Table S3), and the site-directed *in vitro* mutagenesis reaction was carried out using 27.5 ng of *IBA57* cDNA template, according to the manufacturer's instructions (Lightning Quickchange Site directed mutagenesis Kit, Agilent Technologies). The respective inserts were completely sequenced. Details on the sequencing primers are provided in Supplementary Material, Table S4.

Human cell culture studies and RNAi-mediated depletion of IBA57

Human cervix carcinoma cells (HeLa) were cultured and transfected as described previously (42). For transfection, 7.5×10^6 cells were resuspended in 580 µl of transfection buffer, supplemented with 1.5 nm of a small interfering RNA

(siRNA) and 5–10 µg of expression vectors and transfected by electroporation. After 3 days, cells were harvested, re-transfected and grown for another 3 days (12,42). This was repeated once more to intensify the phenotype. Expression of IBA57 was suppressed by a siRNA targeting the IBA57 mRNA at the 3' untranslated region (5'-AGCUCUAU GUUUCAGGGCA-3') purchased from Life Technologies (12). For complementation experiments, pCMV6-IBA57_Q314P-myc was subcloned into IBA57-pEGFP-N3 (12) via *Bgl*II and *Bsr*XI restriction sites to remove the myc-tag. The relative functionality of mutated and wild-type IBA57 was tested by co-transfecting a subset of RNAi-treated cells with equal amounts of expression plasmids encoding either IBA57 carrying the patient mutation at position 314 (IBA57_Q314P) or wild-type IBA57. All cells were then fractionated by digitonin treatment into a soluble fraction containing cytosolic proteins and a membrane fraction containing mitochondria. For inhibition of proteases, transfected cells were treated with either Pefabloc (Carl Roth) or MG132 (Calbiochem) for 16 h before harvest.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Nele Herregods for interpreting the brain MRI and Drs O. Stehling, V. Srinivasan and L.O. Essen for discussion.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work was supported by funding from the Fund for Scientific Research (FWO, Belgium) (grant number G.0221.12, G.0666.06), the Special Research Fund (BOF) from the Ghent University (grant number B/00559/01) and the University of Antwerp; the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant number SFB 593, GRK1216), von Behring-Röntgen Stiftung, Synmikro LOEWE Zentrum and the Max-Planck Gesellschaft to R.L.; the Fund for Scientific Research, Flanders (FWO, Belgium) to senior clinical investigator B.L. and the Aneurysmal Pathology Foundation (Liège, Belgium) to N.A.B.

REFERENCES

- Lill, R. (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*, **460**, 831–838.
- Rouault, T.A. (2012) Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Dis. Model. Mech.*, **5**, 155–164.
- Sharma, A.K., Pallesen, L.J., Spang, R.J. and Walden, W.E. (2010) Cytosolic iron-sulfur cluster assembly (CIA) system: factors, mechanism, and relevance to cellular iron regulation. *J. Biol. Chem.*, **285**, 26745–26751.
- Netz, D.J., Stith, C.M., Stumpf, M., Kopf, G., Vogel, D., Genau, H.M., Stodola, J.L., Lill, R., Burgers, P.M. and Pierik, A.J. (2012) Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 125–132.
- Rudolf, J., Makrantonis, V., Ingledew, W.J., Stark, M.J. and White, M.F. (2006) The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Mol. Cell*, **23**, 801–808.
- Kispal, G., Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Bedekovics, T., Janaky, T., Bassler, J., Aguilar Netz, D.J., Balk, J., Rotte, C. *et al.* (2005) Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *EMBO J.*, **24**, 589–598.
- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A.J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M.A., Weibert, H., Wilbrecht, C. and Mühlhoff, U. (2012) The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, **1823**, 1491–1508.
- Bych, K., Kerscher, S., Netz, D.J., Pierik, A.J., Zwicker, K., Huynen, M.A., Lill, R., Brandt, U. and Balk, J. (2008) The iron-sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. *EMBO J.*, **27**, 1736–1746.
- Sheftel, A.D., Stehling, O., Pierik, A.J., Netz, D.J., Kerscher, S., Elsässer, H.P., Wittig, I., Balk, J., Brandt, U. and Lill, R. (2009) Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 6059–6073.
- Cameron, J.M., Janer, A., Levandovskiy, V., Mackay, N., Rouault, T.A., Tong, W.H., Ogilvie, I., Shoubridge, E.A. and Robinson, B.H. (2011) Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. *Am. J. Hum. Genet.*, **89**, 486–495.
- Navarro-Sastre, A., Tort, F., Stehling, O., Uzarska, M.A., Arranz, J.A., Del Toro, M., Labayru, M.T., Landa, J., Font, A., Garcia-Villoria, J. *et al.* (2011) A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. *Am. J. Hum. Genet.*, **89**, 656–667.
- Sheftel, A.D., Wilbrecht, C., Stehling, O., Niggemeyer, B., Elsässer, H.P., Mühlhoff, U. and Lill, R. (2012) The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation. *Mol. Biol. Cell*, **23**, 1157–1166.
- Mühlhoff, U., Richter, N., Pines, O., Pierik, A.J. and Lill, R. (2011) Specialized function of yeast Isal and Isa2 in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *J. Biol. Chem.*, **286**, 41205–41216.
- Lill, R. and Mühlhoff, U. (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.*, **77**, 669–700.
- Rötig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A. and Rustin, P. (1997) Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.*, **17**, 215–217.
- Camaschella, C., Campanella, A., De Falco, L., Boschetto, L., Merlini, R., Silvestri, L., Levi, S. and Iolascon, A. (2007) The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood*, **110**, 1353–1358.
- Mochel, F., Knight, M.A., Tong, W.H., Hernandez, D., Ayyad, K., Taivassalo, T., Andersen, P.M., Singleton, A., Rouault, T.A., Fischbeck, K.H. *et al.* (2008) Splice mutation in the iron-sulfur cluster scaffold protein ISCU causes myopathy with exercise intolerance. *Am. J. Hum. Genet.*, **82**, 652–660.
- Olsson, A., Lind, L., Thornell, L.E. and Holmberg, M. (2008) Myopathy with lactic acidosis is linked to chromosome 12q23.3–24.11 and caused by an intron mutation in the ISCU gene resulting in a splicing defect. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 1666–1672.
- Tepljakov, A., Obmolova, G., Sarikaya, E., Pullalarevu, S., Krajewski, W., Galkin, A., Howard, A.J., Herzberg, O. and Gilliland, G.L. (2004) Crystal structure of the YgfZ protein from *Escherichia coli* suggests a folate-dependent regulatory role in one-carbon metabolism. *J. Bacteriol.*, **186**, 7134–7140.
- Gelling, C., Dawes, I.W., Richhardt, N., Lill, R. and Mühlhoff, U. (2008) Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Mol. Cell Biol.*, **28**, 1851–1861.
- Onder, O., Yoon, H., Naumann, B., Hippler, M., Dancis, A. and Daldal, F. (2006) Modifications of the lipoamide-containing mitochondrial subproteome in a yeast mutant defective in cysteine desulfurase. *Mol. Cell Proteomics*, **5**, 1426–1436.
- Sheftel, A.D., Stehling, O., Pierik, A.J., Elsässer, H.P., Mühlhoff, U., Weibert, H., Hobler, A., Hannemann, F., Bernhardt, R. and Lill, R. (2010)

- Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 11775–11780.
23. Stehling, O., Netz, D.J., Niggemeyer, B., Röscher, R., Eisenstein, R.S., Puccio, H., Pierik, A.J. and Lill, R. (2008) Human Nbp35 is essential for both cytosolic iron-sulfur protein assembly and iron homeostasis. *Mol. Cell Biol.*, **28**, 5517–5528.
 24. Bayot, A., Gareil, M., Rogowska-Wrzesinska, A., Roepstorff, P., Friguet, B. and Bulteau, A.L. (2010) Identification of novel oxidized protein substrates and physiological partners of the mitochondrial ATP-dependent Lon-like protease Pim1. *J. Biol. Chem.*, **285**, 11445–11457.
 25. Waller, J.C., Alvarez, S., Naponelli, V., Lara-Núñez, A., Blaby, I.K., Da Silva, V., Ziemak, M.J., Vickers, T.J., Beverley, S.M., Edison, A.S. *et al.* (2010) A role for tetrahydrofolates in the metabolism of iron-sulfur clusters in all domains of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10412–10417.
 26. Long, S., Changmai, P., Tsaousis, A.D., Skalicky, T., Verner, Z., Wen, Y.Z., Roger, A.J. and Lukes, J. (2011) Stage-specific requirement for Isa1 and Isa2 proteins in the mitochondrion of *Trypanosoma brucei* and heterologous rescue by human and blastocystis orthologues. *Mol. Microbiol.*, **81**, 1403–1418.
 27. Yoshida, T. and Kikuchi, G. (1973) Comparative study on major pathways of glycine and serine catabolism in vertebrate livers. *J. Biochem.*, **72**, 1503–1516.
 28. Bodner-Leidecker, A., Wendel, U., Saudubray, J.M. and SchadeWaldt, P. (2000) Branched-chain L-amino acid metabolism in classical maple syrup urine disease after orthotopic liver transplantation. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **23**, 805–818.
 29. Fischer, J.C., Ruitenbeek, W., Gabreëls, F.J., Janssen, A.J., Renier, W.O., Sengers, R.C., Stadhouders, A.M., Ter Laak, H.J., Trijbels, J.M. and Veerkamp, J.H. (1986) A mitochondrial encephalomyopathy: the first case with an established defect at the level of coenzyme Q. *Eur. J. Pediatr.*, **144**, 441–444.
 30. Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gérard, B., Rötig, A., Saudubray, J.M. and Munnich, A. (1994) Biochemical and molecular investigation in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta*, **228**, 35–51.
 31. Sottocasa, G., Kuylenshierna, B., Ernster, L. and Bergstrand, A. (1967) An electrontransport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. *J. Cell Biol.*, **32**, 415–438.
 32. Birch-Machin, M.A., Sheperd, I.M., Watmough, N.J., Sherratt, H.S., Bartlett, K., Darley-Usmar, V.M., Milligan, D.W., Welch, R.J., Aynsley-Green, A. and Turnbull, D.M. (1989) Fatal lactic acidosis in infancy with a defect of complex III of the respiratory chain. *Pediatr. Res.*, **25**, 553–559.
 33. DiMauro, S., Servidels, S., Zeviani, M., DiRocco, M., DeVivo, D.C., DiDonato, S., Uziel, G., Berry, K., Hoganson, G., Johnsen, S.D. *et al.* (1987) Cytochrome c oxidase deficiency in Leigh syndrome. *Ann. Neurol.*, **22**, 498–506.
 34. Sere, P.A. (1969) Citrate synthase. *Methods Enzymol.*, **13**, 3–11.
 35. Drapier, J.C. and Hibbs, J.B. Jr., (1996) Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis. *Methods Enzymol.*, **269**, 26–36.
 36. Hatefi, Y. and Stiggall, D.L. (1978) Preparation and properties of succinate: ubiquinone oxidoreductase (complex II). *Methods Enzymol.*, **53**, 21–27.
 37. Trounce, I.A., Kim, Y.L., Jun, A.S. and Wallace, D.C. (1996) Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmittochondrial cell lines. *Methods Enzymol.*, **264**, 484–509.
 38. Van Coster, R., Smet, J., George, E., De Meirleir, L., Seneca, S., Van Hove, J., Sebire, G., Verhelst, H., De Bleecker, J., Van Vlem, B. *et al.* (2001) Blue native polyacrylamide gel electrophoresis: a powerful tool in diagnosis of oxidative phosphorylation defects. *Pediatr. Res.*, **50**, 658–665.
 39. van der Westhuizen, F.H., Smet, J., Levanets, O., Meissner-Roloff, M., Louw, R., Van Coster, R. and Smuts, I. (2010) Aberrant synthesis of ATP synthase resulting from a novel deletion in mitochondrial DNA in an African patient with progressive external ophthalmoplegia. *J. Inherit. Metab. Dis.* <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10545-009-9020-y>. [Epub ahead of print].
 40. Scharpf, R.B., Parmigiani, G., Pevsner, J. and Ruczinski, I. (2008) Hidden Markov models for the assessment of chromosomal alterations using high-throughput SNP arrays. *Ann. Appl. Stat.*, **2**, 687–713.
 41. Vandeweyer, G., Reyniers, E., Wuyts, W., Rooms, L. and Kooy, R.F. (2011) CNV-WebStore: online CNV analysis, storage and interpretation. *BMC Bioinformatics*, **12**, 4.
 42. Biederbick, A., Stehling, O., Röscher, R., Niggemeyer, B., Nakai, Y., Elsässer, H.P. and Lill, R. (2006) Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 5675–5687.

Supplementary Figure Legends**Figure S1. Multi-sequence alignment of IBA57 proteins from higher and lower eukaryotes**

IBA57 protein sequences from various eukaryotes were aligned using MultAlin (*). The amino acid position corresponding to the mutated Q314 in human IBA57 is highlighted in yellow, indicating no conservation of this residue among different eukaryotes.

Figure S2. Quantification of protein levels of IBA57-depleted HeLa cells expressing wild-type or mutant IBA57

HeLa cell extracts as described in Figure 6 were analyzed by western blotting. Quantification was performed using program TINA 20 (Raytest). Data are presented relative to control values as mean \pm SD (n=3).

Figure S3. Mutated IBA57 Q314P restores protein levels decreased in IBA57-deficient cells

HeLa cell extracts as described in Figure 7B were subjected to SDS-PAGE and western blotting using antibodies against the indicated proteins (cf. Figure 6C). A representative result is shown.

(*) Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 10881-10890.

Figure S1: Multi-sequence alignment of IBA57 proteins from higher and lower eukaryotes.

	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
--	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Figure S2: Quantification of protein levels of IBA57-depleted HeLa cells expressing wild-type or mutant IBA57.

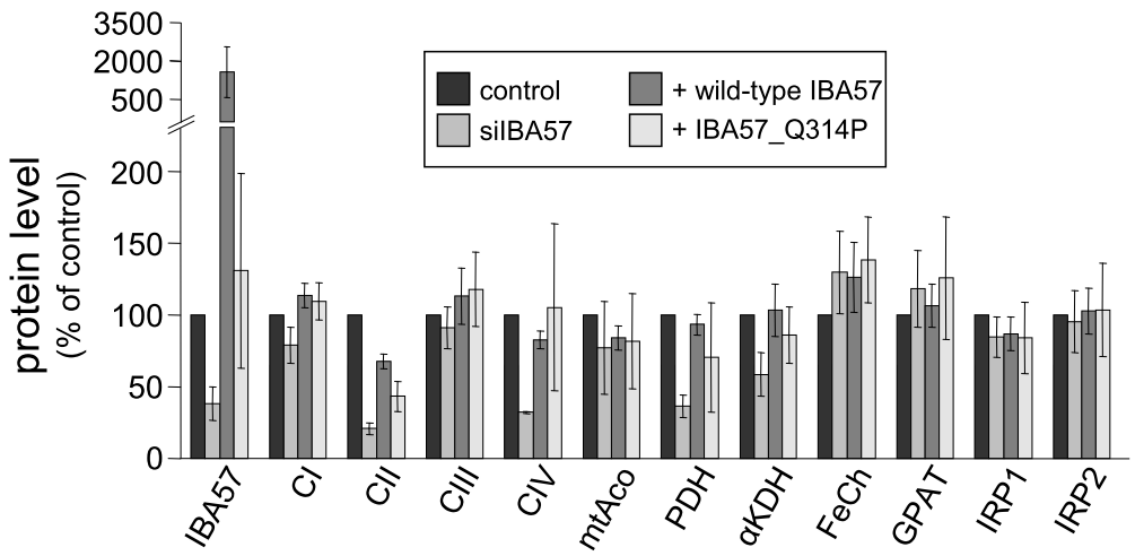
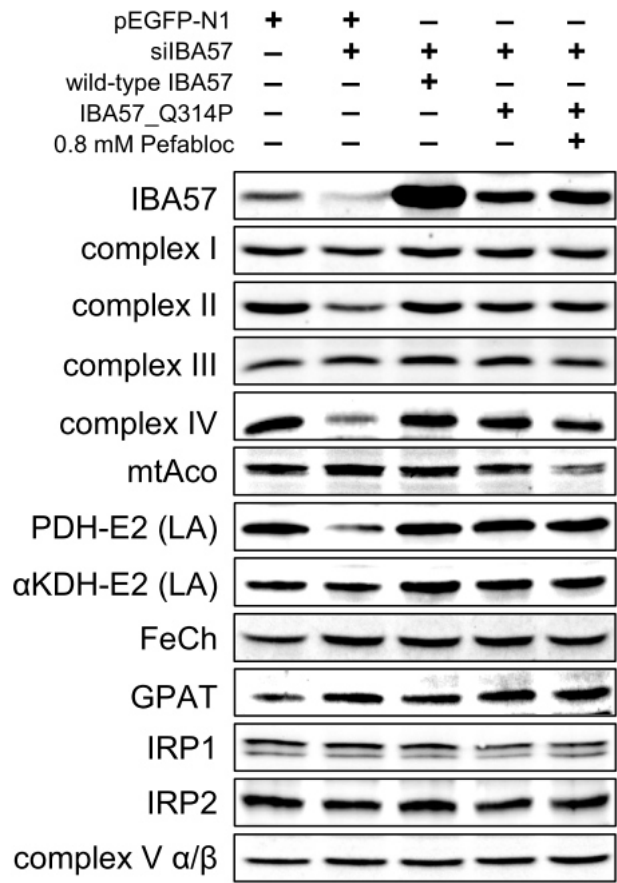


Figure S3: Mutated IBA57_Q314P restores protein levels decreased in IBA57-deficient cells.



6.3 Fe/S Protein Assembly Gene *IBA57* Mutation Causes Hereditary Spastic Paraplegia

Running head: IBA57 mutation causes SPOAN-like phenotype

Alexander Lossos, MD, ^{1*} Claudia Stümpfig, MSc, ^{2*} Giovanni Stevanin, PhD, ^{3,4,5,6*}, Marion Gaussen, MSc, ^{3,4} Bat-El Zimmerman, MSc, ⁷ Emeline Mundwiller, BS, ^{4,6} Moriya Asulin, MSc, ⁷ Liat Chamma, BSc, ⁷ Ruth Sheffer, MD, ⁷ Adel Misk, MD, ⁸ Shlomo Dotan, MD, ⁹ John M. Gombi, MD, ¹⁰ Penina Ponger, MD, ¹ Alexis Brice, MD, ^{4,5,6} Israella Lerer, PhD, ^{7*} Vardiella Meiner, MD, ^{7*} Roland Lill, PhD ^{2,11,12*}

* Equal contribution.

¹ Department of Neurology and Agnes Ginges Center for Human Neurogenetics, Hebrew University-Hadassah Medical Center, Jerusalem, Israel.

² Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg, Robert-Koch-Straße 6, 35032 Marburg, Germany.

³ Laboratoire de Neurogénétique, Ecole Pratique des Hautes Etudes-heSam Université, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, F-75013 Paris, France.

⁴ Inserm U1127, CNRS UMR7225, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 UMR_1127, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, F-75013 Paris, France.

⁵ APHP, Fédération de Génétique, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, F-75013 Paris, France.

⁶ Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Genotyping and Sequencing facility, F-75013 Paris, France.

⁷ Department of Genetics and Metabolic Diseases, Hebrew University-Hadassah Medical Center, Jerusalem, Israel.

⁸ Department of Neurology, Shaare Zedek Medical Center, Jerusalem, Israel.

⁹ Neuro-Ophthalmology Center, Department of Ophthalmology, Hebrew University-Hadassah Medical Center, Jerusalem, Israel.

¹⁰ Department of Radiology, Hebrew University-Hadassah Medical Center, Jerusalem, Israel.

¹¹ Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Karl-von-Frisch-Str. 10, 35043 Marburg, Germany

¹² LOEWE Zentrum für Synthetische Mikrobiologie SynMikro, Hans-Meerwein-Str., 35043 Marburg, Germany

Corresponding authors

1. Vardiella Meiner, MD, Department of Genetics and Metabolic Diseases, Hebrew University-Hadassah Medical Center, PO Box 12000 Jerusalem, 91120 Israel. Office phone: 972-2-6779433; Fax 972-2-6777618; e-mail: vmeiner@hadassah.org.il

2. Roland Lill, PhD, Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg, Robert-Koch-Straße 6, 35032 Marburg, Germany. Office phone: 49-6421-2866449; Fax: 49-6421-2866449; e-mail: lill@staff.uni-marburg.de

Number of characters in the title: 78, and the running head: 43

Number of words in abstract: 246, and the body of the manuscript: 3000

Number of figures: 3, and of tables: 2

This work was financially supported in part by the Israeli MOH grant (#5914) and the Israeli MOH/ERA-Net (#4800), the Agnes Ginges stipend (to B-EA, MA and LC), the French National Agency for Research (to GS), the Verum Foundation (to GS and AB), the Fondation Roger de Spoelberch (to AB), the European community (7th framework program, OMICS, to AB), and the “programme ‘Investissements d’avenir’ ANR-10-IAIHU-06 (to the ICM institute). Generous support from Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 593 and GRK 1216), von Behring-Rontgen Stiftung, LOEWE program of state Hessen, Max-Planck Gesellschaft, Feldberg Foundation, and Fonds der chemischen Industrie is acknowledged (RL).

Authors contribution

Dr Lossos drafted the manuscript for content, including medical writing for content; designed and conceptualized the study and interpreted the data.

Dr Lossos reports no disclosures

Ms Stümpfig drafted the manuscript for content, including scientific writing for content; designed and conceptualized the study and interpreted the data.

Ms Stümpfig reports no disclosures

Dr Stevanin drafted the manuscript for content, including scientific writing for content; designed and conceptualized the study and interpreted the data.

Dr Stevanin reports no disclosures

Ms Gaussen analyzed the data. Ms Gaussen reports no disclosures

Ms Zimmerman analyzed the data. Ms Zimmerman reports no disclosures

Ms Mundwiller analyzed the data. Ms Munwiller reports no disclosures

Ms Asulin analyzed the data. Ms Asulin reports no disclosures

Ms Chamma analyzed the data. Ms Chamma reports no disclosures

Dr Sheffer drafted the manuscript for content, including scientific writing for content; designed and conceptualized the study and interpreted the data.

Dr Sheffer reports no disclosures

Dr Misk drafted the manuscript for content, including scientific writing for content; designed and conceptualized the study and interpreted the data.

Dr Misk reports no disclosures

Dr Dotan drafted the manuscript for content, including scientific writing for content; designed and conceptualized the study and interpreted the data.

Dr Dotan reports no disclosures

Dr Gomori analyzed and interpreted the data. Dr Gomori reports no disclosures

Dr Ponger analyzed and interpreted the data. Dr Ponger reports no disclosures

Dr Brice analyzed and interpreted the data. Dr Brice reports no disclosures

Dr Lerer drafted the manuscript for content, including scientific writing for content; designed and conceptualized the study and interpreted the data.

Dr Lerer reports no disclosures

Dr Meiner drafted the manuscript for content, including scientific writing for content; designed and conceptualized the study and interpreted the data.

Dr Meiner reports no disclosures

Dr Lill drafted the manuscript for content, including scientific writing for content; designed and conceptualized the study and interpreted the data.

Dr Lill reports no disclosures

Abstract

Objective: To present the clinical, molecular and cell biological findings in a family with autosomal recessive form of hereditary spastic paraplegia characterized by a combination of spastic paraplegia, optic atrophy and peripheral neuropathy (SPOAN).

Methods: We used a combination of whole genome linkage analysis and exome sequencing to map the disease locus and to identify the responsible gene. To analyze the physiological consequences of the disease, we employed biochemical and cell biological methods.

Results: Ten members of a highly consanguineous family manifested a childhood-onset SPOAN-like phenotype with slow progression into late adulthood. We mapped this disorder to a locus on chromosome 1q and identified a homozygous donor-splice site mutation in the *IBA57* gene, previously implicated in two infants with lethal perinatal encephalomyopathy. This gene encodes the mitochondrial iron-sulfur (Fe/S) protein assembly factor IBA57. In addition to a severely decreased amount of normal *IBA57* mRNA, patient's cells expressed an aberrantly spliced mRNA with a premature stop codon. Lymphoblasts contained tenfold lower levels of wild-type, but no signs of truncated IBA57 protein. The decrease in functional IBA57 resulted in reduced levels and activities of several mitochondrial [4Fe-4S] proteins, including complexes I and II, while mitochondrial [2Fe-2S] proteins remained normal.

Conclusions: Our findings reinforce the suggested specific function of IBA57 in mitochondrial [4Fe-4S] protein maturation and provide additional evidence for its role in human disease. The less decreased IBA57 protein level in this family explains phenotypic differences compared to the previously described lethal encephalomyopathy with no functional IBA57.

Introduction

Hereditary spastic paraplegia (HSP) is a highly heterogeneous group of neurogenetic disorders with multiple identified genetic loci and causative genes involved in various pathophysiological pathways.^{1,2} Different forms of HSP are distinguished by additional neurological and systemic manifestations, variable age of onset and pattern of inheritance. The combination of spastic paraplegia with optic atrophy and peripheral neuropathy is rare.¹ It was originally described and assigned an acronym SPOAN (OMIM #609541) for its main clinical components.³ Linkage analyses mapped this autosomal recessive (AR) disorder to chromosome 11q13, but no responsible gene has been identified so far.^{3,4} A SPOAN-like phenotype is also a feature of SPG55 (OMIM #615035) with mutations in *C12orf65*⁵ and in SPG57 (OMIM #615658) with mutations in *TGF*.⁶ A similar phenotype is occasionally reported in HSP with *SPG7* mutations (OMIM #607259) encoding paraplegin involved in mitochondrial protein maturation and degradation,⁷ and in autosomal dominant optic atrophy (OMIM #165500) with *OPA1* mutations.⁸

We present clinical, laboratory, and cell biological data of a family with HSP manifesting a SPOAN-like phenotype due to an *IBA57* hypomorphic mutation. The encoded protein is involved in the biogenesis of mitochondrial [4Fe-4S] proteins, yet dispensable for [2Fe-2S] proteins.⁹

Patients and Methods

Patients

Since 2004, we have evaluated 11 members of a highly consanguineous 5-generation family of Arab origin manifesting a SPOAN-like clinical phenotype (Fig 1). Of the living unaffected family members, 9 were available for examination. Clinical diagnosis and prospective follow up was performed using the chart (<http://spatax.wordpress.com/downloads/>) developed by the international SPATAX network.

Whole genome linkage analysis

A whole genome scan was performed on genomic DNA samples obtained from peripheral blood of 15 subjects, including 10 affected individuals, using the Infinium Human Linkage 12 Genotyping BeadChip (Illumina, San Diego, Ca, USA). Genotypes were determined with Bead Studio genotyping module software (Illumina) and multipoint LOD scores were calculated using the MERLIN software¹⁰ assuming a

recessive mode of inheritance considering equal allele frequencies, a 90% penetrance and no phenocopy.

Whole exome sequencing

DNA of 2 patients, IV-7 and IV-4 from separate branches of the family, were processed for exon capture with the SureSelect V4 50Mb kit (Agilent) and massive parallel sequencing on the HighSeq2000 (Illumina) at the Integragen platform (Evry, France) under paired-end 75bp reads. The Burrows-Wheeler algorithm was applied to align sequence reads to the hg19 version of the human genome and variants were called using the GATK software package.^{11, 12} A total of 73,166,396 and 89,810,789 reads were obtained of which 96.2 and 92.4% were mapped to the human genome reference sequence with a mean coverage of 60x and 61x obtained with 71% and 77% of the target regions covered at least 25x for IV-7 and IV-4, respectively. Data were then imported into a dedicated analysis toolset, Eris (Integragen), for further analysis.

Lymphoblastoid cell line preparation and culture

Lymphoblastoid cell lines were derived from patient III-5 and from 4 controls and were cultured using conventional methods. For inhibition of proteases cells were treated with either 0.8 mM Pefabloc (Carl Roth) or 10 μ M MG132 (Calbiochem) for 16 h prior to harvest.

cDNA preparation and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated from fresh blood and lymphoblastoid lines using conventional methods. cDNA was synthesized using SuperScript[®] II reverse transcriptase (Invitrogen). RT-PCR was performed using the primers 5'-CATCTTGTACGGGCTCCA-3' and 5'-ACTTGCCACAGTCTGTCC-3' corresponding to cDNA positions 330 and 928, respectively (NM_001010867). PCR products were analyzed on 2% agarose gel, extracted from the gel with the QIAquick[®] Gel Extraction kit (QIAGEN) and sequenced with the BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystems).

Mutation analysis

Mutation screening was based on the introduction of a *Pst*I restriction site in the mutant allele and performed by PCR followed by *Pst*I digestion (primer details available upon request).

Western blot analysis

Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting. Antibodies were targeted against IBA57, ¹³ NDUFA9, NDUFA13, SDHB (MitoSciences), Rieske, COX-2, F₁α/β (H. Schagger and I. Wittig), ACO2 (Thermo Scientific), lipoic acid (Calbiochem), IRBP1 (R. Eisenstein) and tubulin (clone DM1A; Sigma-Aldrich). For quantification of the detected protein levels, at least 3 independent experiments were performed.

Enzyme assays

Spectrophotometric activity of aconitase, complex II, complex IV, citrate synthase and lactate dehydrogenase ¹⁴⁻¹⁶ and sample preparation for BN-PAGE and complex I in-gel activity measurement ¹⁷ were performed as described. For analysis of enzyme activities, data were obtained from at least 3 distinct experiments.

Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consents

The study was approved by the institutional and national review boards. Informed consent was obtained prior to enrollment from all the participants.

Results**Patients manifest a SPOAN-like phenotype**

The main clinical findings are summarized in Table 1. Of the 11 clinically affected subjects, 10 presented with very slowly progressive childhood-onset gait impairment. On examination, they manifested mild to moderate spastic paraparesis with knee hyperreflexia and bilateral extensor plantar response. Reduced or absent ankle reflexes in 7/10 patients together with distal leg atrophy (Supp Fig 3) and distal superficial sensory loss suggested an associated peripheral neuropathy. Additionally, 6/9 patients available for funduscopy had optic nerve atrophy and reduced visual acuity. Although the findings were similar in character, their intensity and age of onset somewhat varied. Early development, age at independent walking and school achievements were reported normal, and in adulthood all lead an independent life. None manifested cognitive impairment, seizures, ophthalmoplegia, scoliosis or limb contractures, and patient III-5 had late-onset diabetes mellitus and ischemic heart disease. Over the period of 7 years, 4/10 patients were available for follow-up examination showing a very slow progression of their functional motor and visual disability.

Subject IV-8 was reported to develop gait problems and cognitive impairment after sustaining head trauma at the age of 3 years. On examination, she had bilateral optic

atrophy, spastic paraparesis and distal sensory deficit in the legs, and was therefore concluded to be clinically affected.

Routine metabolic screening, plasma amino acids, glycine and lactate were normal in patients III-5 and III-6. Peripheral nerve conduction study obtained in 4 patients (Table 2) demonstrated reduced compound motor action potentials and velocities with normal sensory conduction, indicating predominantly motor and mainly axonal peripheral neuropathy, and electromyography demonstrated mild chronic neurogenic changes in 2/2 patients. Formal neuro-ophthalmologic examination performed in 4 patients (Table 2) confirmed optic nerve atrophy (Supp Fig 1) with reduced visual acuity, visual field defects, prolonged evoked potential latencies, and thinning of the peripapillary retinal ganglion cell fibers (Supp Fig 2).

Cerebral MRI obtained in 3 patients (Table 2) demonstrated bilateral optic nerve atrophy and scattered foci of T2/FLAIR-hyperintensity in the cerebral white matter, some of which appeared with central cystic cavitation (Supp Fig 4). In addition, patient III-5 had mild-moderate cerebellar, corpus callosum and cervical spinal cord atrophy, which was not present in a study from 7 years earlier. There was no abnormal iron deposition on susceptibility weighted imaging and no elevated lactate on MR spectroscopy (MRS).

Mutation in IBA57 causes aberrant mRNA splicing, reduces native IBA57 mRNA and leads to a frame-shift and a truncated protein

Whole genome linkage analysis identified 2 regions with multipoint LOD scores of +3.2 and +3.3 on chromosomes 1 and 19, respectively. In chromosome 1, 24 successive SNP markers covering 24.6 Mb were homozygous while on chromosome 19, patients from one branch were homozygous and from the other were compound heterozygous for markers covering 43.6 Mb. These regions were confirmed using microsatellite markers (data not shown). The region on chromosome 19 was considered unlikely based on the high consanguinity rate in this family. Furthermore, linkage was uninformative in 9 additional regions where LOD scores ranged from -1.8 to +0.2.

Given the large shared genomic region on chromosome 1 encompassing at least 180 genes, we proceeded with whole exome sequencing in patients IV-7 and IV-4 (Fig 1). The number of called variants (Indels and SNVs) was 61,908 and 62,433, respectively. Out of these, 41 were common to both patients at the homozygous state, rare (<1%) in variant databases (EVS, 1,000 genomes, HapMap) and affected the coding sequences (non synonymous or located to splice site). Three of these variants were located in the linked, non-excluded regions on chromosome 1, including: (i) c.1381C>T (p.P461S) in *TRIM17* (NM_016102.3) affecting an amino-acid conserved only in mammals and

predicted to be tolerated by AlignGVGD,¹⁸ SIFT program,¹⁹ and MutationTaster;²⁰ (ii) c.5773_5776del (p.Lys1925Thrfs6*) in *DNAH14* (NM_001373.1), encoding a dynein heavy chain, found 242 times and 17 times in the homozygous state in exome analyses of 2,923 healthy individuals available through the Exome Variant Server (NHLBI GO Exome Sequencing Project, ESP, Seattle, WA, URL: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>; (iii) c.678A>G (p.Q226Q) in *IBA57* (NM_001010867.2), encoding a mitochondrial Fe/S protein assembly factor abundant in brain, heart and liver. The mutation was predicted to alter correct splicing. This variant was not found in the public databases such as the Exome Variant Server, NHLBI Exome Sequencing Project, Seattle, Washington USA (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) and was validated using the Sanger method (Fig 2A). Restriction analysis-based screening of the entire family using *Pst*I showed perfect segregation, with homozygosity found only in the patients (not shown). Screening of 340 anonymous chromosomes from a similar ethnic background and originating from the same Palestinian region identified 2 heterozygous carriers of the variant.

In order to evaluate the predicted outcome of this mutation, we studied cDNA obtained both from fresh lymphocytes and from transformed lymphoblastoid cells of patient III-5. A prominent 692-bp PCR product was identified with a fainter band (~10-20%) of 599-bp corresponding to the predicted normal splicing product (Fig 2C). Sequencing analysis of the larger fragment revealed that this transcript retained intron 2, which is altogether 93-bp. This aberrant transcript with the inserted intron leads to a frame-shift and is predicted to generate a truncated protein with only 280 amino-acid residues, i.e. the original first 226 and an additional 54 amino acids which are different from the ones in the wild-type protein (Fig 2B-D).

Diminished IBA57 protein levels cause specific defects in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins

From the cDNA studies, we suspected a decreased IBA57 protein level. Analysis of cell extracts of the lymphoblastoid cell line from patient III-5 revealed a 90% reduction of IBA57 protein in accordance with the amount of residual wild-type mRNA (Fig 2C and 3A-B). Immunostaining showed a 30-40% reduction of the respiratory chain complex I subunits NDUFA13 and NDUFA9, and of one subunit of complex II (Fig 3A-B). This was accompanied by a quantitatively similar reduction of the respective enzymatic activities normalized for the mitochondrial enzyme citrate synthase (Fig 3C-D). In contrast, protein levels of respiratory complexes III, IV and V were unaffected with non significant slight decrease in complex IV activity. These changes are consistent with the well-established function of IBA57 in the biogenesis of [4Fe-4S] proteins such as

complexes I and II, but not of [2Fe-2S] proteins such as complex III. Notably, the defects were rather mild in comparison to the previous report of an *IBA57* mutation associated with an almost complete loss of functional IBA57 protein.²¹

Next, we examined the function of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. While the steady-state protein level of mitochondrial aconitase (mitoAco) was unaffected, its enzymatic activity was slightly decreased (Fig 3). This effect is specific, because the activity of cytosolic aconitase (cytoAco), the holoform of iron regulatory protein 1 (IRP1), showed no significant changes in both protein level and activity (Fig 3). Lipoic acid synthase (LIAS) contains two [4Fe-4S] clusters essential for the synthesis of lipoic acid, a cofactor of, e.g., pyruvate dehydrogenase (PDH) and α -ketoglutarate dehydrogenase (α KGDH). Measurement of the lipoylation status of the E2 subunits of these latter enzymes serves as an indirect but reliable estimate of the Fe/S maturation efficiency of LIAS.¹³ Therefore, we monitored the presence of lipoic acid in the E2 subunits of PDH and α KGDH in the patient's cells by immunoblotting using a lipoic acid-specific antibody.²² For both E2 subunits, we observed a 25% decline in their lipoic acid content, while the protein level of PDH-E2 slightly increased (Fig 3A). This finding is consistent with the idea that lipoic acid synthesis was slightly decreased in the patient's cells due to a maturation defect of the [4Fe-4S] protein LIAS.

The aberrant splicing of the patient's *IBA57* transcript produced an additional mRNA encoding a truncated, 280 amino-acid residue long protein (Fig 2). Yet, immunoblotting with an IBA57-specific polyclonal antibody did not detect any additional band in the corresponding molecular mass range (Supp Fig 5A). We thus suspected an efficient degradation of the truncated protein by proteases. Earlier studies had shown that a myc-tagged version of a mutated IBA57 protein can be partially protected from degradation by the presence of the protease inhibitors.²¹ To test whether the truncated 280 amino-acid residue protein can be similarly stabilized, we treated a lymphoblastoid cell line from patient III-5 with the protease inhibitors Pefabloc and MG132. However, no protein band of relevant size was detectable in immunoblots, indicating that proteolysis inhibition was ineffective in stabilizing the truncated IBA57 (Supp Fig 5A). Taken together, we conclude that the aberrant *IBA57* mRNA splicing in our patients led to a truncated coding region that did not yield a stable protein. The residual amount of normally spliced wild-type *IBA57* mRNA produced tenfold lower amounts of IBA57 protein to reach a functionally critical level, as reflected in mild but significant defects of mitochondrial [4Fe-4S] proteins, but not [2Fe-2S] proteins. This finding is fully consistent with the biochemical function of IBA57.

Since the biochemical phenotype was assayed on lymphoblastoids, it would be interesting also to look at other tissues and to determine the tissue specificity of this splicing defect.

Discussion

Using a combination of genetic linkage, exome sequencing, and expression studies, we identified a homozygous hypomorphic c.678A>G mutation in the Fe/S protein assembly gene *IBA57* in a highly consanguineous multiplex family with HSP. Patients presented with a slowly progressive spastic paraparesis of childhood-onset associated in the majority with optic atrophy and peripheral neuropathy. The typical clinical combination, taken together with AR inheritance, enables the diagnosis of SPOAN-like phenotype in this family. The relatively slow progression into adulthood and less severe clinical involvement clearly distinguish the disorder in our patients from previously reported forms (Table e-1).

Because multisystem neurological syndrome with prominent optic atrophy is an important feature in several mitochondrial encephalomyopathies, including *C12orf65*,^{6, 23} *SPG7*⁷ and *OPA1*⁸-related disorders with SPOAN-like phenotype, involvement of a mitochondrial protein in this family may not be surprising. *IBA57* encodes the mitochondrial Fe/S protein assembly factor IBA57 which is a part of a complex mitochondrial iron/sulfur cluster (ISC) assembly machinery comprised of at least 16 distinct components.^{9, 13} The biosynthetic process is initiated with the synthesis of [2Fe-2S] clusters on a scaffold protein, a step requiring six ISC proteins.⁹ The subsequent generation of [4Fe-4S] clusters and their insertion into appropriate apoproteins is facilitated by the coordinated action of further ISC maturation factors, including ISCA1, ISCA2 and IBA57. Consequently, cells lacking any of the latter ISC proteins cannot assemble mitochondrial [4Fe-4S] proteins, while the generation of [2Fe-2S] proteins is normal.

The c.678A>G mutation identified in this family leads to a splicing aberration and results both in the reduction of the wild-type *IBA57* transcript and in the generation of an additional aberrant transcript with a splicing error. The latter mRNA encompasses a shorter coding region and is predicted to cause a truncation of the IBA57 protein. Accordingly, the unique biochemical phenotype in this family may be satisfactorily explained by a significantly reduced IBA57 content accompanied by decreased levels and activities of the respiratory chain complexes I and II, both containing [4Fe-4S] clusters. In contrast, the [2Fe-2S] cluster-containing complex III remained unaffected. These results are consistent with the reported role of IBA57 in mitochondrial [4Fe-4S] protein maturation.^{13, 21} This observation is further supported by analysis of other

mitochondrial [4Fe-4S] proteins. The decreased lipoylation of the lipoic acid-dependent PDH and α KGDH in this family is likely caused by functional defect of the mitochondrial enzyme LIAS that depends on two [4Fe-4S] clusters for function.^{13, 21} Another reported target of IBA57 is the citric acid cycle enzyme mitoAco containing one [4Fe-4S] cluster.^{9, 13, 21} While the steady-state protein level of mitoAco was unaffected in our patient, its enzymatic activity was slightly decreased, consistent with the relatively mild clinical phenotype.

A qualitatively similar but significantly more severe biochemical profile was previously described in two siblings with multiple mitochondrial dysfunction syndrome 3 (MMDS3; OMIM #615330) caused by a homozygous c.941A>G, p.Gln314Pro mutation in *IBA57*.²¹ This mutation affects both IBA57 protein function and stability leading to the degradation by proteases to below functionally critical levels.²¹ Consequently, both siblings manifested lethal encephalopathy, multiple malformations and myopathy associated with hyperglycinemia, related to the lipoic acid-dependent glycine cleavage system, and elevated serum and MRS lactate due to the mitochondrial respiratory dysfunction. In contrast, our patients manifested childhood-onset, slowly progressive course of their multisystem neurological disorder into late adulthood without hyperlactemia or hyperglycinemia, probably related to the sufficient residual function of IBA57 in generating mitochondrial [4Fe-4S] clusters. Another biochemical difference is related to the activity of cytochrome oxidase (respiratory complex IV), which does not contain Fe/S clusters. In contrast to our patients, cytochrome oxidase was severely diminished in infants with MMDS3 or upon RNAi-mediated depletion of IBA57 in cell culture,^{13, 21} probably a pleiotropic result of a significant defect in the respiratory chain and other [4Fe-4S] proteins.

The particular SPOAN-like phenotype documented in this family may possibly be related to tissue-specific differences in aberrant *IBA57* mRNA splicing and selective vulnerability of the central and peripheral nervous system structures. The fact that IBA57 plays no role in cytosolic-nuclear Fe/S biogenesis or cellular iron homeostasis explains normal hemoglobin and absent cerebral iron overload on MRI in our patients. The observed clinical SPOAN-like phenotype and a slowly progressive course likely result from a relatively mild biochemical phenotype due to the presence of residual IBA57 and a hypomorphic *IBA57* mutation. Taken together, our findings explain the apparent differences from the severe perinatal MMDS3 and reinforce the suggested function of IBA57 as a late-acting ISC maturation factor of [4Fe-4S] proteins.

References

1. Finsterer J, Loscher W, Quasthoff S, et al. Hereditary spastic paraplegias with a autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance. *J Neurol Sci* 2012;318:1-18.
2. Novarino G, Fenstermaker AG, Zaki MS, et al. Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *Science* 2014;343:506-511.
3. Macedo-Souza LI, Kok F, Santos S, et al. Spastic paraplegia, optic atrophy, and neuropathy is linked to chromosome 11q13. *Ann Neurol* 2005;57:730-737.
4. Macedo-Souza LI, Kok F, Santos S, et al. Spastic paraplegia, optic atrophy, and neuropathy: new observations, locus refinement, and exclusion of candidate genes. *Ann Hum Genet* 2009;73:382-387.
5. Shimazaki H, Takiyama Y, Ishiura H, et al. A homozygous mutation of *C12orf65* causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55). *J Med Genet* 2012;49:777-784.
6. Beets C, Johnson A, Schuh AL, et al. Inhibition of *TFG* function causes hereditary axon degeneration by impairing endoplasmic reticulum structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:5091-5096.
7. Klebe S, Depienne C, Gerber S, et al. Spastic paraplegia gene 7 in patients with spasticity and/or optic neuropathy. *Brain* 2012;135:2980-2993.
8. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Gorman GS, et al. Multi-system neurological disease is common in patients with *OPA1* mutations. *Brain* 2010;133:771-786.
9. Lill R. Function and biogenesis of iron-sulfur proteins. *Nature* 2009;460:831-838.
10. Abecasis GR, Chemy SS, Cookson WO, Cardon LR. Merlin-rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 2002;30:97-101.
11. DePristo MA, Banks E, Poplin R, et al. A framework for variation discover and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 2011;43:491-498.
12. McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010;20:1297-1303.
13. Sheftel AD, Wilbrecht C, Stehling O, et al. The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation. *Mol Biol Cell* 2012;23:1157-1166.
14. Drapier JC, Hibbs JB Jr. Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis. *Methods Enzymol* 1996;269:26-36.

15. Hatefi Y, Stiggall DL. Preparation and properties of succinate: ubiquinone oxidoreductase (complex II). *Methods Enzymol* 1978;53:21-27.
16. Trounce IA, Kim YL, Jun AS, Wallace DC. Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines. *Methods Enzymol* 1996;264:484-509.
17. Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, et al. Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. *Mol Cell Biol* 2009;29:6059-6073.
18. Tavtigian SV, Deffenbaugh AM, Yin L, et al. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *J Med Genet* 2006;43:295-305.
19. Ng PC, Henikoff S. SIFT: predicting amino acids changes that affect protein function. *Nucl Acids Res* 2003;31:3812-3814.
20. Schwarz JM, Rödelberger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* 2010;7:575-576.
21. Ajit Bolar N, Vanlander AV, Wilbrecht C, et al. Mutation of the iron-sulfur cluster assembly gene IBA57 cause severe myopathy and encephalopathy. *Hum Mol Genet* 2013;22:2590-602.
22. Gelling C, Dawes IW, Richhardt N, et al. Mitochondrial IBA57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Mol Cell Biol* 2008;28:1851-1861.
23. Spiegel R, Mandel H, Saada A, et al. Delineation of *C12orf65* phenotypes: a genotype-phenotype relationship. *Eur J Hum Genet* 2014; DOI: 10.1038/ejhg.2013.284

Acknowledgements

We thank the patients and their families for the participation in this study and Marian Vidal-Jorge and Sylvie Forlani for their technical assistance.

Figures and Tables

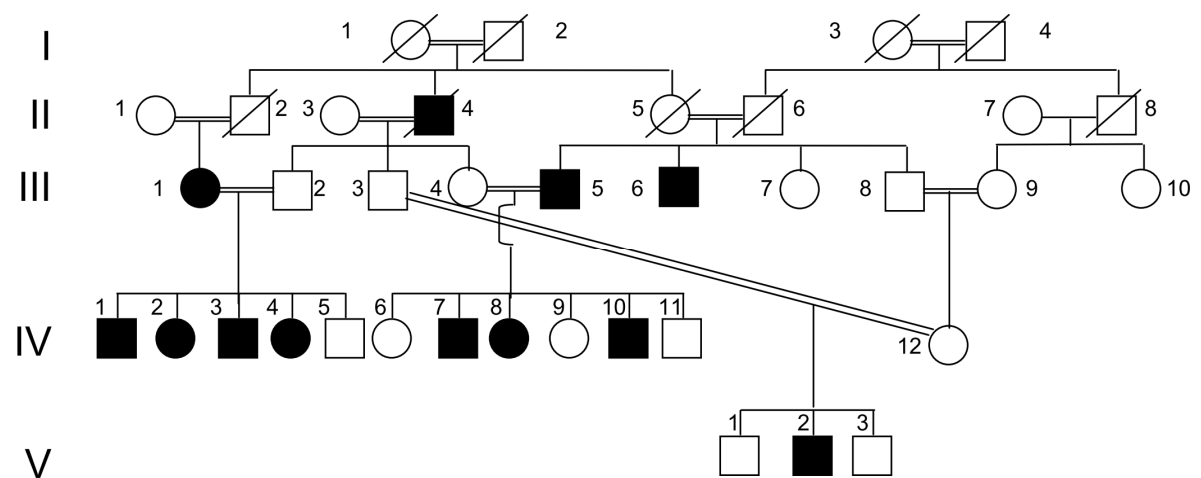


FIGURE 1: Pedigree of the family. Circles represent women and squares men. Filled symbols indicate affected individuals, strikethrough deceased, and double lines consanguinity by descent.

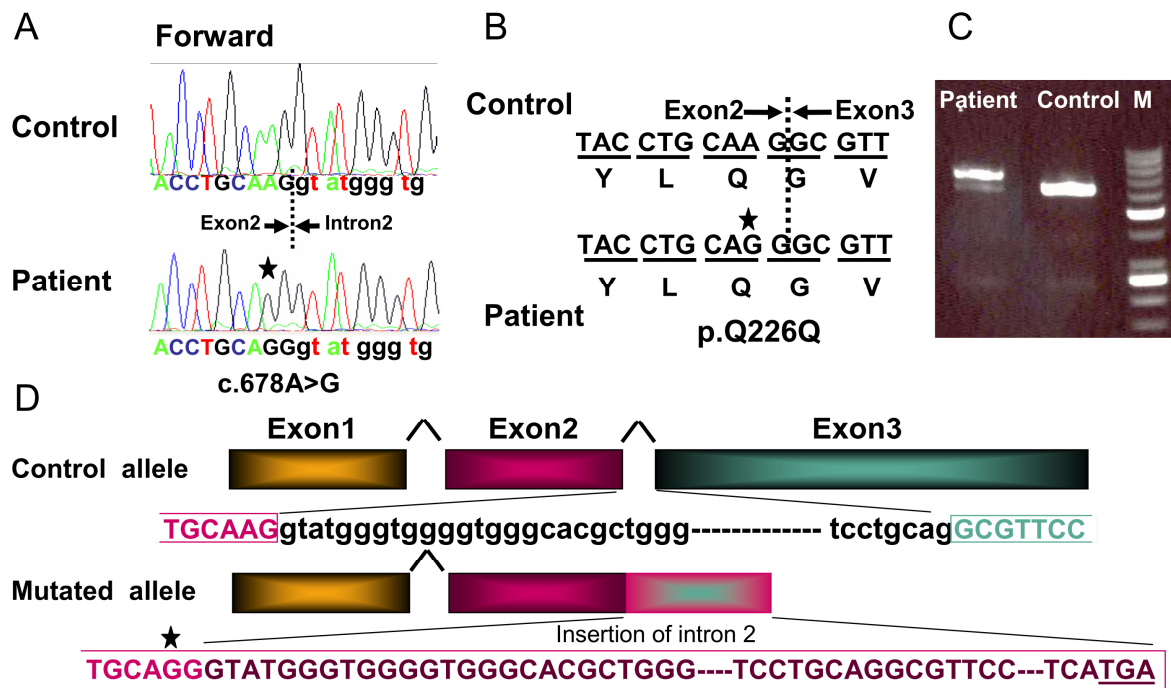


FIGURE 2: *IBA57* mutation identified in patients with SPOAN-like phenotype. (A) DNA sequencing identified a c.678A>G mutation, corresponding to a synonymous mutation of the *IBA57* coding region. (B) Schematic representation of the splicing aberration induced by c.678A>G. Intron 2 is inserted following the mutation located in the 3' end of exon 2 (star). A>G base substitution at the 3' end of exon 2 disrupts the splicing and leads to insertion of intron 2 into the coding transcript. (C) Electrophoresis of cDNA obtained from the mRNA extracted from the patient's III-5 EBV-immortalized lymphoblastoid cells. Note an additional large band in the patient's lane. (D) Results of the cDNA sequencing. A frameshift mutation due to the splicing aberration and the insertion of intron 2 leads to a translation termination codon that results in a truncated *IBA57* protein. A sample from a healthy sibling was used as control.

In parts (A) (B) and (D) the exonic sequence is denoted by uppercase letters, while the intronic sequence is denoted by lowercase letters. In the lower part of panel D darker upper case letters denote nucleotides that became exonic following splice aberration.

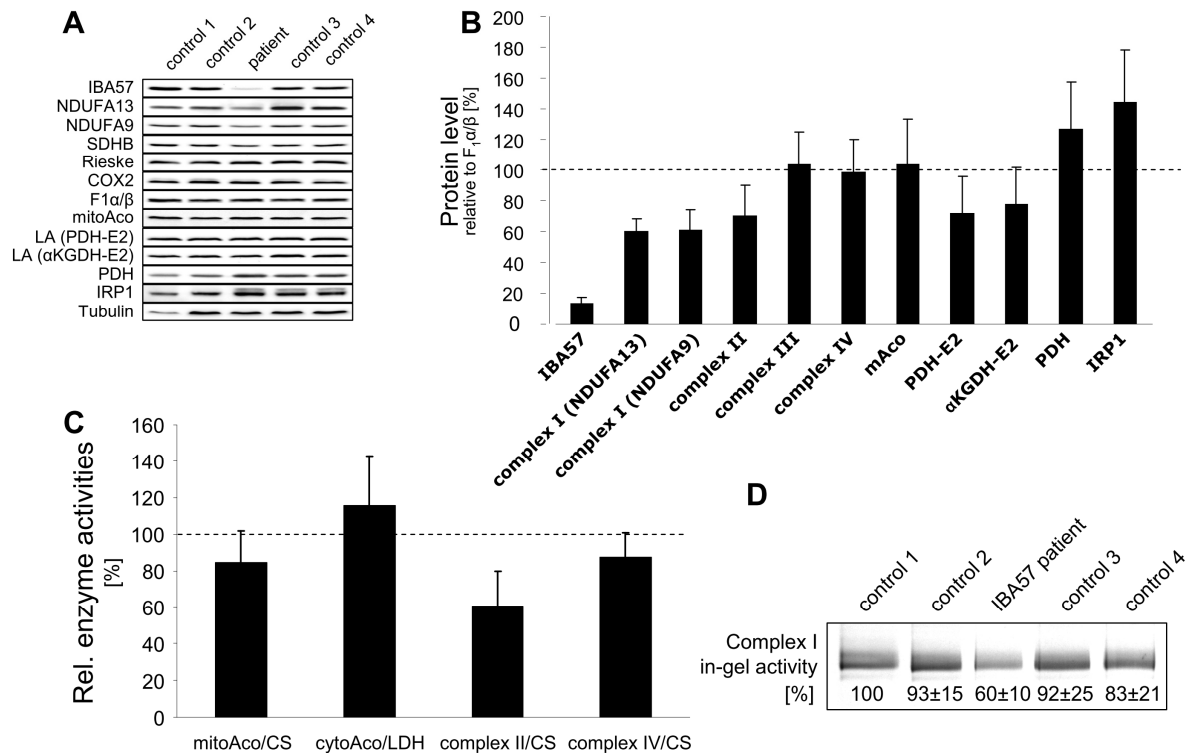


FIGURE 3: A+B Mutant IBA57 lymphoblastoid cells show decreased levels of certain respiratory chain complexes and lipoylated proteins. **A.** Lymphoblastoid cells from patient III-5 and four control cell lines were lysed and the extracts subjected to SDS-PAGE. Immunoblotting was performed using specific antibodies against the mitochondrial proteins IBA57, respiratory chain complex I (subunits NDUFA13, NDUFA9), complex II (SDHB), complex III (Rieske protein), complex IV (COX2), complex V (F₁α/β), aconitase (mitoAco), and pyruvate dehydrogenase (PDH). Iron regulatory protein 1 (IRP1) is the apoform of cytosolic aconitase. The lipoic acid (LA) content of the E2 subunits of pyruvate dehydrogenase (PDH-E2) and α-ketoglutarate dehydrogenase (αKGDH-E2) was tested using a LA-specific antiserum. Staining against tubulin served as a loading control. Representative immunoblots of 3 independent experiments are shown. **B.** Levels of the indicated proteins were quantified and normalized to F₁α/β levels. Values obtained from the patient's III-5 cell line were normalized to respective mean values calculated from four distinct control cell lines. Data are presented as mean ± SD (N=3 independent experiments).

C+D. Diminished activities of the [4Fe-4S] cluster-dependent respiratory complexes in the mutant IBA57 cells. **C.** Lymphoblastoid cell lines from patient III-5 and from controls were lysed and separated by digitonin treatment and centrifugation at 15,000 xg into a soluble (cytosol) and a membrane fraction containing mitochondria. Samples were analyzed for the indicated enzyme activities by spectrophotometric assays. Data were

normalized to enzyme activities of the non-Fe/S proteins citrate synthase (CS) and lactate dehydrogenase (LDH) as indicated, and presented relative to the values for the mean of the control cell lines. **D.** Cell lines from A were mechanically lysed and subjected to blue native-PAGE. Complex I activity was estimated by an in-gel activity assay. A representative result is shown. Band intensities were quantified and normalized to CS and the mean \pm SD (N=6 independent experiments) is shown below the gel.

TABLE 1. Main clinical findings in the patients with a homozygous c.678A>G mutation in the IBA57 gene.

Patient	III-1	III-5	III-6	IV-1	IV-2	IV-3	IV-4	IV-7	IV-8 ^c	IV-10	V-2
Sex/Age at, yr	F	M	M	M	F	M	F	M	F	M	M
Gait impairment	10	10	8	6	6	6	9	10	3	12	8
Visual complains	-	12	10	-	14	-	-	12	10	14	12
Initial evaluation	41	58	45	18	17	15	11	32	29	24	11
Current	48	65	53	25	24	22	18	39	36	32	12
Spastic paraparesis (severity) ^a	Mild	Moderate	Moderate	Mild	Mild	Mild	Mild	Moderate	Mild	Mild	Mild
Deep tendon reflexes, ^b R/L											
Arms	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Knees	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Ankles	3/3	0/0	3/3	1/1	0/0	0/0	3/3	0/0	3/3	1/1	1/1
Extensor plantar response, R/L	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Distal leg atrophy	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Pes cavus	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
Distal sensory deficit	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Functional status (gait)	U/U	S/L	U/L	U/U	U/L	U/U	U/U	S/L	S/L	U/L	U/U
Optic atrophy, R/L	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	NA	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-

Abbreviations: R=right; L=left; U/U unable to run but walking is unaided and unlimited; U/L=walking unaided but limited;

S/L=walking with one stick; NA=not available.

^a Based on the Spastic Paraplegia Rating Scale (<http://spatax.wordpress.com/downloads/>)

^b Deep tendon reflex grading: 0 absent; 1 reduced; 2 normal; 3 increased.

^c Subject IV-8 also has cognitive impairment since head trauma at the age of 3 years.

TABLE 2. Main laboratory findings in four patients with the homozygous c.678A>G mutation in the *IBA57* gene.

Patient	III-5	III-6	IV-7	IV-10
Nerve conduction study (R or L), ^a age, yr	65	46	38	32
Tibial distal motor latency (<5 ms)	4	3.8	UE	4.5
Tibial CMAP (>5 mV)	0.5	0.8	UE	1.8
Tibial motor CV (>43 m/s)	36	48	UE	33.3
Sural SNAP (>5 µV)	4.9	29	10	27
Sural CV (>40 m/s)	36.7	47.8	36.8	50
Chronic neurogenic EMG changes	NA	+	NA	+
Optic nerve studies, R/L, age, yr	58-64	46-53	32-39	24-30
Visual acuity	0.1/FC	0.2/0.1	0.5/0.8	0.1/0.1
Visual fields	CD/CD	CS/CS	CS/SNS	CD/CD
Flash VEP (<120 ms)	131/142	124/130	173/173	128/133
OCT	NA	DT/DT	DT/DT	DT/DT
ERG	NA	N	NA	N

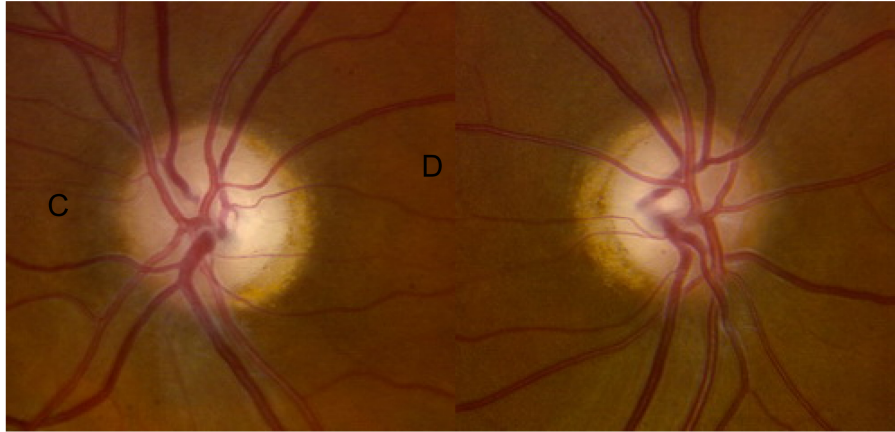
Cerebral MRI, age, yr	65	53	39	NA
Optic nerve atrophy	+	+	+	
Corpus callosum atrophy	+	-	-	
Cerebellar atrophy	+	-	-	
Cervical spinal cord atrophy	+	-	-	
Cerebral white matter hyperintense foci	+	+	-	
Elevated MRS lactate	-	-	NA	NA

Abbreviations: R=right; L=left; CMAP=compound motor action potential; CV=conduction velocity; SNAP=sensory nerve action potential; EMG=electromyography; UE=unexcitable; FC=finger counting; CS=central scotoma, CD=concentric constriction defect; SNS=superior nasal step; VEP=visual evoked potentials; OCT=optical coherence tomography; DT=diffuse thinning; ERG=electroretinogram; NA=not available; N=normal; MRS=MR spectroscopy.

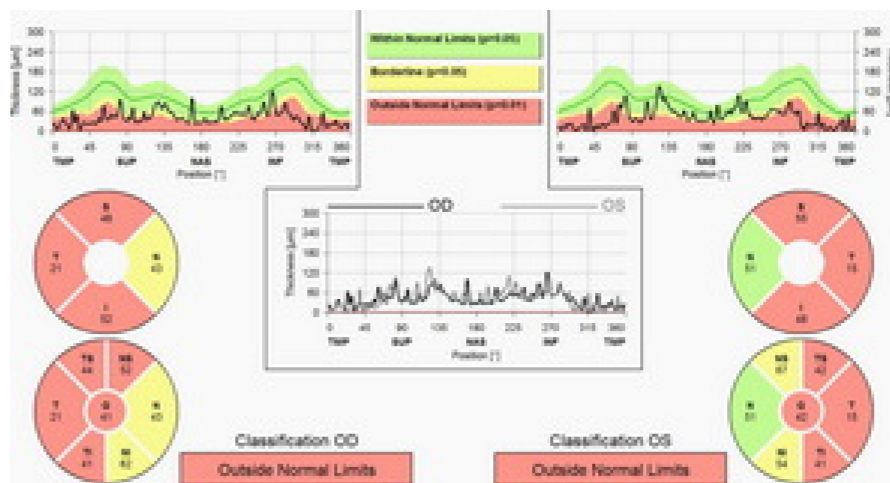
^a Normal values are shown in parentheses.

Supplementary Data

Supp FIGURE 1. Bilateral optic nerve atrophy.



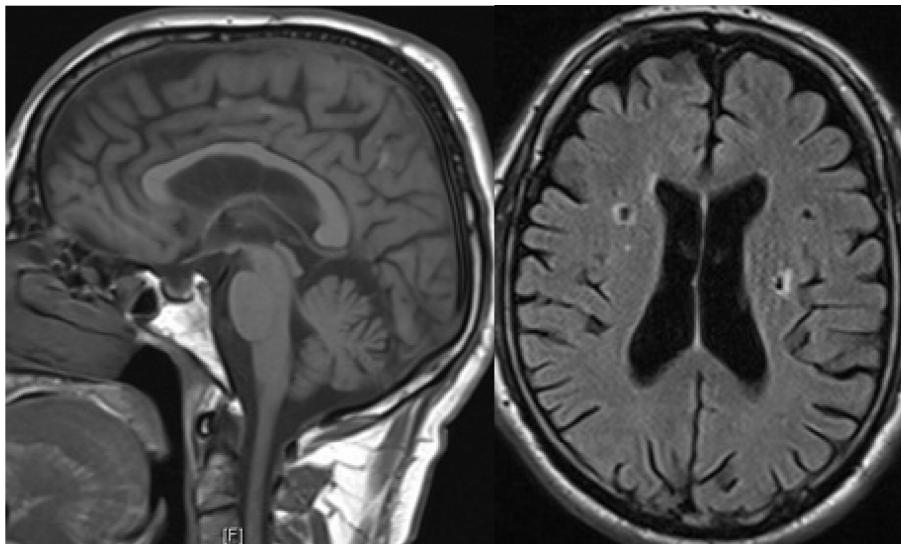
Supp FIGURE 2. Optical coherence tomography in patient III-6 showing diffuse thinning of the peripapillary retinal ganglion cell fibers of the optic nerve heads.



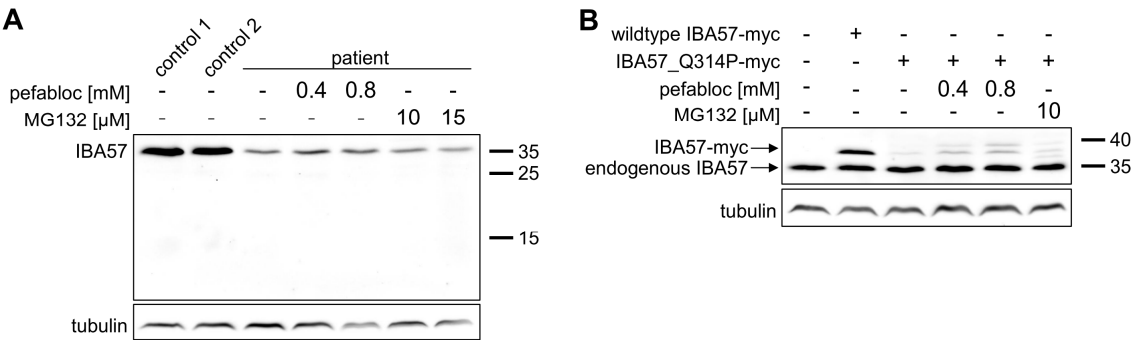
Supp FIGURE 3. Pes cavus in patient III-5.



Supp FIGURE 4. Cerebral MRI in patient III-5 showing mild corpus callosum atrophy and scattered foci of fluid attenuated inversion recovery (FLAIR)-hyperintensity in the cerebral white matter, some of which appeared with central cystic cavitation.



Supp FIGURE 5. Truncated IBA57 protein is not detectable after protease inhibition. (A) Lymphoblastoid cells from patient III-5 were treated with the indicated concentration of Pefabloc or MG132 for 16 h prior to cell harvest and lysis. Extracts of these cells and control cells were analyzed for IBA57 by immunoblotting. Staining against tubulin served as a loading control. (B) HeLa cells were transfected with a plasmid encoding wild-type or myc-tagged mutant IBA57 (Q314P) as reported in Ajit Bolar et al. 2013. As indicated, cells were treated with Pefabloc or MG132 for 16 h before harvest. Cell lysates were analyzed via immunoblotting illustrating endogenous IBA57 and plasmid-borne IBA57-myc protein levels. Staining against tubulin served as a loading control.



Supp TABLE 1. Reported disorders with SPOAN and SPOAN-like phenotype.

Current	SPG57 (6)	SPG55 (5)	SPOAN (3)	Disorder (reference)
Arab/AR	India/AR	Japan/AR	Brazilian/AR	Origin/inheritance
Childhood	Childhood	Childhood	Infancy	Onset
+	+	+	+	Optic atrophy
+	+	+	+	Spastic paraplegia
+	+	+	+	Peripheral neuropathy
+	+	+	+	Distal muscular atrophy
+	+	+	+	Distal sensory deficit
-	Arms	Arms	Dysarthria, startle, scoliosis, joint contractures	Additional involvement
Slow	Slow	Slow	Slow	Progression
Mild	Moderate	Moderate	Severe	Functional disability
Optic atrophy, white matter changes, corpus callosum and spinal cord atrophy	Prominent cisterna magna, white matter changes	Not reported	Spinal cord atrophy	MRI findings
<i>IBA57</i>	<i>TFG</i>	<i>C12orf65</i>	11q13	Locus/gene

7. Angabe der eigenen Anteile an den für die Dissertation berücksichtigten Publikationen

Publikation 1 (P1):

Sheftel AD*, Wilbrecht C*, Stehling O, Niggemeyer B, Elsässer HP, Mühlenhoff U, Lill R (2012). The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation. Mol Biol Cell. 23(7):1157-66. *Geteilte Erstautorenschaft.

Eigenanteil: eigenständige Durchführung von Transfektionen und Behandlung der Zellen mit MG132 sowie Messung der zellulären Hämmenge; Mithilfe bei der Durchführung der Westernblots und anschließender Immunodetektion sowie bei allen spektrophotometrischen Messungen und den licht- und konfokalmikroskopischen Aufnahmen; Mithilfe bei der Auswertung aller dargestellten Untersuchungen.

Publikation 2 (P2):

Ajit Bolar N*, Vanlander AV*, Wilbrecht C*, Van der Aa N, Smet J, De Paepe B, Vandeweyer G, Kooy F, Eyskens F, De Lattre E, Delanghe G, Govaert P, Leroy JG, Loeys B, Lill R, Van Laer L, Van Coster R (2013). Mutation of the iron-sulfur cluster assembly gene IBA57 causes severe myopathy and encephalopathy. Hum Mol Genet. 22(13):2590-602. *Geteilte Erstautorenschaft.

Eigenanteil: Durchführung von Transfektionen in HeLa-Zellkultur, Analyse dieser Zellen mittels Westernblot/Immunodetektion und spektrophotometrischen Messungen, Auswertung der selbst durchgeführten Untersuchungen.

Publikation 3 (P3):

Lossos A*, Stümpfig C*, Stevanin G*, Gaussen M, Zimmerman B, Mundwiler E, Asulin M, Chamma L, Sheffer R, Misk A, Dotan S, Gomori JM, Ponger P, Brice A, Lerer I, Meiner V, Lill R. Fe/S Protein Assembly Gene *IBA57* Mutation Causes Hereditary Spastic Paraplegia. Wird veröffentlicht in Neurology. *Geteilte Erstautorenschaft.

Eigenanteil: Behandlung der Lymphoblastoidzellen mit Protease-Inhibitoren und Durchführung aller biochemischen Analysen der Lymphoblastoidzellen (Westernblot/Immunodetektion und spektrophotometrische Messungen), Auswertung der selbst durchgeführten Untersuchungen.

8. Weitere Publikationen und Tagungsbeiträge

Im Verlauf der Promotion wurden Beiträge zu folgenden Publikationen geleistet:

Lill R, Hoffmann B, Molik S, Pierik AJ, Rietzschel N, Stehling O, Uzarska MA, Webert H, Wilbrecht C, Mühlenhoff U (2012). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1823(9):1491-508. Review.

Stehling O, Wilbrecht C, Lill R (2014). Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie*. 100C:61-77. Review.

Tagungsbeiträge (Auswahl):

Wilbrecht C, Sheftel AD, Stehling O, Niggemeyer B, Elsässer HP, Mühlenhoff U, and Lill R. The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for mitochondrial [4Fe-4S] protein maturation (Poster) - 6th International Conference on the Biogenesis of Iron Sulphur Proteins and Regulatory Functions 2011, Cambridge, UK

Wilbrecht C. How are [4Fe-4S] proteins matured? The role of the mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins (Vortrag) – Klausurtagung des SFB 593 2012, Riezlern, Österreich

Wilbrecht C, Sheftel AD, Mühlenhoff U, Pierik A, Stehling O, and Lill R. The ISC Proteins Isa1, Isa2, and Iba57 are Required for Mitochondrial [4Fe-4S] Protein Maturation (Poster) - FEBS/EMBO Course on Mitochondria in life, death and disease 2012, Heraklion, Griechenland

Wilbrecht C, Vanlander AV, Ajit Bolar N, Loeys B, Van Laer L, Van Coster R, and Lill R. A mutation in the iron-sulfur cluster biogenesis factor IBA57 causes a fatal mitochondrial disease with respiratory insufficiency, and hyperglycinemia (Poster) – BiolIron 2013, London, UK

Wilbrecht C. Role of the ISC protein IBA57 in human mitochondrial disease (Vortrag) – Klausurtagung des SFB 593 2013, Riezlern, Österreich

9. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Aigner, Alter, Bals, Bastians, Bauer, Becker, Bette, Bouchard, Brehm, Bremmer, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, del Rey, Eickmann, Eilers, Ellenrieder, Elsässer, Fritz, Garn, Garten, Glorius, Gromes, Grzeschik, Hasilik, Hassel, Hilt, Jacob, Jungclas, Kaufmann, Kirchner, Koczulla, Koolman, Kölsch, Kuhlmann, Lill, Lillig, Löffler, Lüers, Maisner, Moll, Mühlberger, Mühlenhoff, Müller-Brüsselbach, Nain, Nau, Naud, Oliver, Petz, Pierik, Plant, Portenier, Preisig-Müller, Rausch, Röhm, Schäfer H., Schäfer M., Schümann, Shams-Eldin, Suske, Tebbe, Vollmer, Westermann, Wrocklage, Yu

10. Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst meinem Doktorvater Prof. Dr. Roland Lill für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung des spannenden Forschungsthemas. Besonders möchte ich ihm danken für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die stete Diskussionsbereitschaft und wertvollen Ratschläge während meiner gesamten Promotionszeit.

Unseren Kooperationspartnern in Belgien, Israel und Frankreich, allen voran Arnaud Vanlander, Nikhita Ajit Bolar, Alexander Lossos und Giovanni Stevanin, danke ich für die angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit.

An dieser Stelle möchte ich allen Patienten und ihren Familien für ihre Teilnahme an den hier vorgestellten Studien meinen Dank aussprechen. Ich hoffe, dass unsere Arbeit einen kleinen Beitrag zum Verständnis der Erkrankungen leisten konnte und die Betroffenen mit Hoffnung in die Zukunft blicken lässt.

Besonderer Dank gilt Dr. Oliver Stehling für seine herzliche und gewissenhafte Art. Unsere zahlreichen fachlichen Diskussionen waren mir immer eine große Hilfe für das Voranschreiten meiner Forschungsprojekte. Für alle kleineren und größeren Probleme des Laboralltags hatte er immer ein offenes Ohr und die passenden Lösungen parat.

Ich danke meinem früheren Betreuer Dr. Alex Sheftel, der mich durch die Anfänge meiner Laborarbeit führte, und dadurch den Grundstein für diese Arbeit legte.

Ich möchte weiterhin meinen „humanen“ Kollegen Brigitte Niggemeyer und Ralf Rösser danken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und allzeit für ein Schwätzchen zu haben waren.

Allen Mitarbeitern der Zellbio danke ich für die stets angenehme und fröhliche Atmosphäre, und die vielen lustigen Begebenheiten und Aktivitäten am Rande des Laboralltags.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, allen voran meinen Eltern, für ihre stete Unterstützung in allen Lebenslagen.

Abschließend möchte ich Martin Stümpfig danken, der während der Zeit in der Zellbio nicht nur zu meinem besten Freund geworden ist, sondern auch zu meinem Ehemann. Liebster Martin, danke für alles!